

Untersuchungen zur Ausscheidung modifizierter
RNA-Kataboliten im Urin bei verschiedenen Säugern

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Heinrich Topp
aus Hagen

Bochum 1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543113_0022

**Untersuchungen zur Ausscheidung modifizierter
RNA-Kataboliten im Urin bei verschiedenen Säugern**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der

Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Heinrich Topp

aus Hagen

Bochum 1988

Die vorliegende Arbeit ist das Ergebnis einer
unabhängigen, sorgfältigen und gewissenhaften
Arbeit.

Die Arbeit ist in der
Form eines Aufsatzes
abgegeben worden und
enthält keine
anderen als
eigene Gedanken und
Erkenntnisse.

Die Arbeit ist
eigene Arbeit
und enthält
keine fremden
Gedanken und
Erkenntnisse.

Referent: Prof. Dr. O. Pongs
Korreferent: Prof. Dr. W. Rüger

Eingereicht am 14.07.1988
Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.1988

**Verzeichnis der wichtigsten Publikationen, die Ergebnisse aus dieser
Dissertation enthalten:**

Sander G, Wieland J, Topp H, Heller-Schöch G, Erb N, Schöch G (1985)
An improved method for the simultaneous analysis of normal and modified urinary nucleosides and nucleobases by high performance liquid chromatography
Clin Chim Acta 152: 355-361

Topp H, Sander G, Heller-Schöch G, Schöch G (1985)
A high-performance liquid chromatographic method for the determination of pseudouridine and uric acid in native human urine and ultrafiltrated serum
Anal Biochem 150: 353-358

Sander G, Topp H, Heller-Schöch G, Wieland J, Schöch G (1986)
Ribonucleic acid turnover in man: RNA catabolites in urine as measure for the metabolism of each of the three major species of RNA
Clin Sci 71: 367-374

Topp H, Sander G, Heller-Schöch G, Schöch G (1987)
Determination of 7-methylguanine, N²,N²-dimethylguanosine, and pseudouridine in ultrafiltrated serum of healthy adults by high-performance liquid chromatography
Anal Biochem 161: 49-56

Schöch G, Sander G, Topp H, Heller-Schöch G (1988, in press)
Modified nucleosides and nucleobases in urine and serum as selective markers for the whole-body turnover of tRNA, rRNA and mRNA-cap - future prospects and impact
In: Gehrke CW, Kuo KC (eds) Chromatographic and Other Analytical Methods in Nucleic Acids Modification Research, Vol II Modified Nucleosides in Cancer and Normal Metabolism, Elsevier, Amsterdam

1.	Einleitung und Untersuchungsziel	1
1.1.	Vorkommen modifizierter RNA-Bausteine bei Säugern	1
1.2.	Stoffwechsel modifizierter RNA-Bausteine bei Säugern	12
1.3.	Deutung von modifizierten RNA-Kataboliten im Urin als Indikatoren für den RNA-Umsatz	17
1.4.	Studienaufbau	22
2.	Experimenteller Teil	24
2.1.	Analyse modifizierter Ribonucleoside und modifizierter Nucleobasen aus Urin	24
2.1.1.	Probanden	24
2.1.2.	Versuchstiere und Tierhaltung	24
2.1.3.	Injektionsversuche mit modifizierten Ribonucleosiden bei <i>Tupaia</i> s	25
2.1.4.	Kombinierte Vorfraktionierung von Ribonucleosiden und Nucleobasen	26
2.1.5.	Selektive Vorfraktionierung von Ribonucleosiden	29
2.1.6.	HPLC-Verfahren zur Messung von Ribonucleosiden und Nucleobasen	30
2.1.7.	Bestimmung von Kreatinin	32
2.2.	Analyse von Pseudouridin, 7-Methylguanin, N^2,N^2 -Dimethylguanosen und Kreatinin aus Serum und Plasma	32
2.2.1.	Enteweißung von Serum und Plasma	32
2.2.2.	Vorfraktionierung von Ribonucleosiden mittels Affinitätschromatographie	33
2.2.3.	HPLC-Verfahren	34
2.3.	Versuche zur Verstoffwechselung modifizierter Ribonucleoside und modifizierter Nucleobasen in Gewebeerextrakten	34
2.3.1.	Herstellung von Rohhomogenaten und postribosomalen Überständen	34

2.3.2.	Inkubation von N^2,N^2 -Dimethylguanosin mit Rohhomogenaten	36
2.3.3.	Inkubation von modifizierten Ribonucleosiden und modifizierten Nucleobasen mit postribosomalen Überständen	37
2.3.4.	Vorfraktionierung der Ribonucleoside sowie der Nucleobasen und Quantifizierung mittels HPLC	37
3.	Ergebnisse und Einzelkommentare	39
3.1.	Ausscheidung modifizierter Ribonucleoside und modifizierter Nucleobasen im Urin	39
3.1.1.	Bestimmung modifizierter Ribonucleoside aus Urin	39
3.1.2.	Bestimmung von Pseudouridin aus Urin	52
3.1.3.	Bestimmung modifizierter Nucleobasen aus Urin	58
3.1.4.	Modifizierte RNA-Kataboliten aus dem Abbau von tRNA	69
3.1.5.	Modifizierte RNA-Kataboliten aus dem Abbau von rRNA	76
3.1.6.	Modifizierte RNA-Kataboliten aus dem Abbau von tRNA und rRNA	79
3.1.7.	Herkunft von m^7Gua im Urin	82
3.1.8.	Ausscheidung modifizierter Nucleoside bei Tupaias nach i.p. Gabe	87
3.2.	Modifizierte RNA-Kataboliten und Kreatinin in Serum und Plasma	96
3.2.1.	Pseudouridin, 7-Methylguanin, N^2,N^2 -Dimethylguanosin sowie Kreatinin	96
3.2.2.	Umwandlung von 7-Methylguanosin zu 7-Methylguanin im Serum	103
3.3.	Inkubation von modifizierten Ribonucleosiden bzw. modifizierten Nucleobasen mit Gewebeextrakten	109
3.3.1.	Inkubation von modifizierten Ribonucleosiden bzw. Nucleobasen mit postribosomalen Überständen aus Rattenleber	109
3.3.2.	Inkubation von N^2,N^2 -Dimethylguanosin mit Rohhomogenaten aus verschiedenen Rattengeweben	113
3.3.3.	Inkubation von modifizierten Ribonucleosiden bzw. Nucleobasen mit postribosomalen Überständen aus Tupaialeber	114

	Seite
4. Diskussion	119
4.1. Ausscheidung tRNA-spezifischer modifizierter RNA-Kataboliten: Vergleich mit der durchschnittlichen Verteilung in cytoplasmatischer tRNA	119
4.2. Ausscheidung modifizierter rRNA-Kataboliten: Vergleich mit der durchschnittlichen Verteilung in cytoplasmatischer rRNA	121
4.3. Vergleich der Verteilung einiger modifizierter RNA-Bausteine in RNA einer "idealisierten Säugerzelle" mit der Verteilung dieser Bausteine in Urin	123
4.4. Herkunft von 7-Methylguanin im Urin	125
4.5. Weitgehend quantitative Ausscheidung von Pseudouridin, 3-Methyluridin und N ² ,N ² -Dimethylguanosin nach i.p. Gabe bei Tupaia	127
4.6. Verstoffwechselung modifizierter Ribonucleoside und modifizierter Nucleobasen in Gewebeextrakten	129
4.7. Modifizierte RNA-Kataboliten in Serum und Plasma	132
4.8. Schlußfolgerungen: Grundlagen der Ganzkörper-Umsatzberechnung von tRNA, rRNA und mRNA aus der Ausscheidung modifizierter RNA-Kataboliten	134
5. Zusammenfassung	139
6. Literaturverzeichnis	142

Verzeichnis der Abkürzungen

Nucleoside (geordnet nach Hauptkomponenten)

Purinabkömmlinge

A	Adenosin
m ¹ A	1-Methyladenosin
m ⁶ A	N ⁶ -Methyladenosin
t ⁶ A	N-[(9-β-D-Ribofuranosylpurin-6-yl) carbamoyl]-L-threonin
mt ⁶ A	N-[(9-β-D-Ribofuranosylpurin-6-yl)N-methylcarbamoyl]-L-threonin
ms ² t ⁶ A	N-[(9-β-D-Ribofuranosyl-2-methyl thiopurin-6-yl)carbamoyl]-L-threonin
i ⁶ A	N ⁶ -Isopentenyladenosin
m ⁶ ₂ A	N ⁶ ,N ⁶ -Dimethyladenosin
Am	2'-O-Methyladenosin
m ⁶ Am	2'-O-Methyl-N ⁶ -methyladenosin
G	Guanosin
m ¹ G	1-Methylguanosin
m ² G	N ² -Methylguanosin
m ⁷ G	7-Methylguanosin
m ² ₂ G	N ² ,N ² -Dimethylguanosin
m ² ₃ , ² ₇ G	N ² ,N ² ,7-Trimethylguanosin
Gm	2'-O-Methylguanosin
I	Inosin
m ¹ I	1-Methylinosin
Q	Queuosin
galQ	β-D-Galactosylqueuosin
manQ	β-D-Mannosylqueuosin
yW	Wybutosin
ozyW	Wybutoxosin

Pyrimidinabkömmlinge

C	Cytidin
m ⁵ C	5-Methylcytidin
m ³ C	3-Methylcytidin
ac ⁴ C	N ⁴ -Acetylcytidin
Cm	2'-O-Methylcytidin
U	Uridin
D	Dihydrouridin
Ψ	Pseudouridin
amΨ	3-(3-Amino-3-carboxypropyl)-1-methylpseudouridin
Ψm	2'-O-Methylpseudouridin
m ³ U	3-Methyluridin
m ⁵ U	5-Methyluridin
acp ³ U	3-(3-Amino-3-carboxypropyl)uridin
cm ⁵ U	5-Carbamoylmethyluridin
mcm ⁵ U	5-Methoxycarbonylmethyluridin
s ² U	2-Thiouridin
mcm ⁵ s ² U	5-Methoxycarbonylmethyl-2-thiouridin
Um	2'-O-Methyluridin
m ⁵ Um	2'-O-Methyl-5-methyluridin

Externer Standard

Tub	7-Deazaadenosin (Tubercidin)
-----	------------------------------

Nucleobasen (geordnet nach Hauptkomponenten)

Purinabkömmlinge

Ade	Adenin
Gua	Guanin
m ¹ Gua	1-Methylguanin
m ² Gua	N ² -Methylguanin
m ⁷ Gua	7-Methylguanin



VI

$m_2^2\text{Gua}$	N^2,N^2 -Dimethylguanin
$OH^8m^7\text{Gua}$	8-Hydroxy-7-methylguanin

Pyrimidinabkömmlinge

Cyt	Cytosin
-----	---------

Externer Standard

$m^6\text{Isocyt}$	2-Amino-4-hydroxy-6-methylpyrimidin (6-Methylisocytosin)
--------------------	---

weitere Abkürzungen (alphabetisch)

A_{254nm}, A_{280nm}	Absorption bei 254nm bzw. 280nm
AUFS	"absorption units full scale", Absorptionseinheiten bei Vollausschlag
$\times g$	Vielfache der Erdbeschleunigung
HPLC	"high-performance liquid chromatography", Hochleistungs-Flüssigchromatographie
i.p.	intraperitoneal
RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	Messenger-RNA
rRNA	Ribosomen-RNA
tRNA	Transfer-RNA
URNAs	Uridylsäure-reiche kleine RNAs des Zellkerns ("small nuclear" RNAs)
S	Sedimentationskonstante
SD	Standardabweichung
TCA	Trichloressigsäure
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH-Wert mit HCl eingestellt
UV	ultraviolett
VK	Variationskoeffizient (Standardabweichung in Prozent)

Materialien

<u>Standardsubstanzen</u>	Hersteller	Katalog-Nummer	
A	Sigma	A	9251
C	Serva		17920
G	Sigma	G	6752
I	Fluka		57470
U	Sigma	U	3750
m ¹ A	Sigma	M	5001
m ⁵ C	Sigma	M	4254
m ¹ G	Sigma	M	6254
m ² G	Sigma	M	4004
m ₂ ² G	Pharmacia P-L Biochemicals		27-4299
m ⁷ G	Sigma	M	0627
m ¹ I	Serva		29370
Ψ	Sigma	P	1658
m ³ U	Sigma	M	4129
m ⁵ U	Serva		29675
Tubercidin	Sigma	T	0642
Ade	Sigma	A	8626
Gua	Sigma	G	0381
Cyt	Sigma	C	3506
m ¹ Gua	Fluka		67070
m ² Gua	Sigma	H	3881
m ₂ ² Gua	Sigma	D	5008
m ⁷ Gua	Sigma	M	0502
m ⁶ Isocyt	Sigma	A	7629
Harnsäure	Merck		817
Kreatinin	Merck		5208

Material für Ultrafiltration

Mikro-Kollodiumhülsen	Sartorius	SM	13202
-----------------------	-----------	----	-------

VIII

<u>Material für Chromatographie</u>	Hersteller	Katalog- Nummer
AG 1-X8 (100-200 mesh)	Bio Rad	140-1444
Affi-Gel 601 (Phenylborsäure-Gel)	Bio Rad	153-6101
Dionex DC-6A	Dionex	25025
Nucleosil 120-5 C ₁₈	Macherey-Nagel	71247

Chemikalien

Aceton, reinst	Merck	13
Ameisensäure, p.a.	Merck	264
Ammoniaklösung, p.a.	Merck	6432
Ammoniumdihydrogen- phosphat, p.a.	Merck	1126
Ammoniumformiat, rein	Riedel-de Haën	25204
Isopropylalkohol, p.a.	Merck	9634
Kaliumchlorid, p.a.	Merck	4936
Magnesiumchlorid, p.a.	Merck	5833
2-Mercaptoethanol, reinst	Serva	28625
Methanol, für die Chro- matographie	Merck	6007
Methanol, p.a.	Merck	6009
Natriumhydroxid, p.a.	Merck	6498
Saccharose, für die Dichte- gradientenzentrifugation	Merck	7654
Trichloressigsäure, p.a.	Merck	807
Tris (hydroxymethyl)- aminomethan, p.a.	Merck	8382

1. Einleitung und Untersuchungsziel

In allen RNA-Klassen werden sogenannte modifizierte Nucleotide gefunden, die, wie heute bekannt ist, bis auf wenige Ausnahmen durch posttranskriptionale Substitutionen am Basenring und/oder an der Ribose entstehen. Die Funktion dieser hochspezifischen und auffallend konservativen "Modifikationen" ist noch weitgehend unbekannt. Säuger scheiden mit dem Urin zahlreiche modifizierte Ribonucleoside und einige modifizierte Nucleobasen aus. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, inwieweit aus der Ausscheidung dieser modifizierten RNA-Kataboliten Rückschlüsse auf den Ganzkörperumsatz von Gesamt-RNA bzw. von einzelnen RNA-Klassen bei Säugern gezogen werden können. Zu diesem Zweck werden zunächst die heute bekannten Daten bezüglich des Vorkommens der verschiedenen modifizierten RNA-Bausteine in den einzelnen RNA-Klassen betrachtet. Sodann wird erörtert, wie weit sich auf der Basis von Literaturangaben und eigenen Experimenten zeigen läßt, daß spezifische modifizierte RNA-Kataboliten, die sich für die Berechnung des Abbaus (bzw. im "steady state" des "Umsatzes") einzelner RNA-Klassen heranziehen lassen, die entscheidende Voraussetzung für derartige Berechnungen, nämlich eine quantitative Ausscheidung, erfüllen.

1.1. Vorkommen modifizierter RNA-Bausteine bei Säugern

Modifizierte Ribonucleoside sind neben den unmodifizierten Grundbausteinen A, G, C und U Bestandteile aller RNA-Klassen. Dabei ist der Modifizierungsgrad, das heißt die Anzahl modifizierter Nucleoside relativ zur Anzahl unmodifizierter Nucleoside, in den einzelnen RNA-Klassen unterschiedlich (Björk, 1984; Schöch et al, 1988a). Cytoplasmatische tRNA weist mit durchschnittlich 17 % modifizierten Bausteinen den höchsten Modifizierungsgrad aller RNA-Klassen auf (berechnet nach Sprinzel et al, 1985). Die gut charakterisierten snRNAs (small nuclear RNAs) U1 - U6 enthalten durchschnittlich 3.5 % - 12 % modifizierte Reste (berechnet nach Busch et al, 1982). Cytoplasmatische rRNA (28S + 18S + 5.8S RNA) enthält durchschnittlich 3 % modifizierte Nucleoside (berechnet nach Khan et al, 1978; Hughes & Maden, 1978). Ribosomale 5S RNA ist unmodifiziert (Björk, 1984). In cytoplasmatischer mRNA von

Eukaryonten finden sich modifizierte Nucleoside in den verschiedenen 5'-terminalen Cap-Strukturen (Abb. 1). Außerdem findet sich in den meisten mRNA-Molekülen kettenintern durchschnittlich ein m^aA-Rest pro 1000 Nucleotide (Moss, 1984). In einigen Cap-Strukturen von Säuger-mRNA kommt neben den 2'-O-Methylribonucleosiden auch m^aAm vor (Wei, 1975), das zusätzlich am Basenring methyliert ist.

7-Methylguanosin

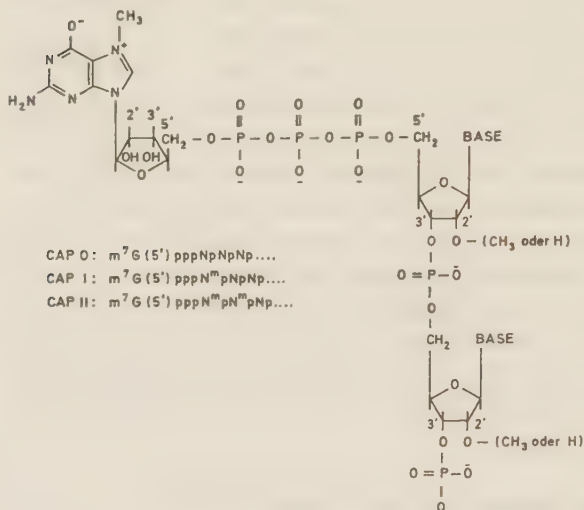


Abbildung 1:

5' terminale Cap-Strukturen eukaryontischer mRNAs (nach Moss, 1984). Hochgestelltes m bedeutet Methylierung an der Ribose. N = Nucleosid.

Transfer-RNA ist nicht nur durch einen hohen und mit steigendem phylogenetischen Rang der Organismen zunehmenden Gehalt an modifizierten Nucleosiden gekennzeichnet (Björk, 1984), sondern auch durch die Vielfalt unterschiedlicher Modifikationen. Dabei weisen die verschiedenen tRNA-Spezies jeweils eigene spezifische Sätze an modifizierten Bausteinen auf. Abbildung 2 zeigt modifizierte Nucleoside und ihre Positionen innerhalb der Sekundärstruktur von cytoplasmatischer eukaryontischer tRNA (Erklärungen der Abkürzungen s. S. IV - V).

In der dargestellten Sekundärstruktur der tRNA repräsentieren die Kreise Positionen, die in allen tRNAs mit Nucleosiden besetzt sind. Oval sind Positionen gekennzeichnet, in denen in einigen tRNA-Spezies zusätzliche Nucleoside vorkommen. Die dick umrandeten Kreise bezeichnen invariante oder semivariante Nucleoside; d.h. in allen tRNAs sind die entsprechenden Positionen immer mit den gleichen oder häufig mit einem der bezeichneten Nucleoside besetzt (Sprinzl et al, 1987).

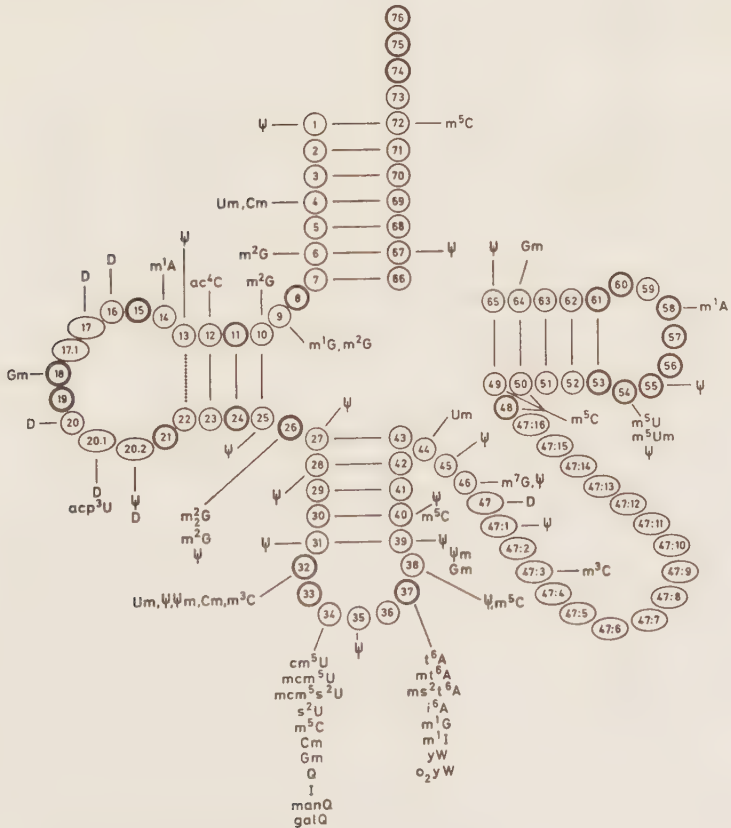


Abbildung 2:
Modifikationen in tRNA von Eukaryonten (nach Björk, 1984)

Anteilmäßig sind bei den meisten modifizierten Nucleosiden in eukaryontischer cytoplasmatischer tRNA ein bis zwei H-Atome durch Methylgruppen substituiert, die sich an verschiedenen Positionen des Basenringes und in der 2'-O-Position der Ribose befinden können. Daneben kommen andere geringgradig modifizierte Nucleoside wie z. B. γ (s. Abb. 3, S. 21), D, I, ac⁴C, s²U vor, ferner eine Gruppe von Nucleosiden, die als "hypermodifiziert" bezeichnet werden (Adamiak & Gornicki, 1985). Diese "hypermodifizierten" Nucleoside finden sich innerhalb der tRNA-Moleküle fast ausnahmslos in der Wobble-Position im Anticodon (Position 34) sowie an das Anticodon angrenzend (Position 37).

Tabelle 1 zeigt die für cytoplasmatische tRNA berechnete durchschnittliche Häufigkeit des Vorkommens der vier normalen sowie von modifizierten Nucleosiden. Zugrunde gelegt wurden 64 ausgewählte Isoakzeptoren für alle 20 Aminosäuren. Davon stammten 47 (73.4 %) von Säugern, 1 (1.6 %) vom Huhn, 11 (17.2 %) von Hefen und 2 (3.1 %) von einem Säuger-Virus (M-Mulv.). Zusammenfassend wird im folgenden vereinfachend von "Säuger"-tRNA gesprochen (Sander et al, in Vorbereitung). Eine Komplettierung der Säuger-Daten wird angestrebt, dürfte aber das Gesamtbild nicht entscheidend verändern.

Die Berechnung der durchschnittlichen Häufigkeit von Nucleosiden in tRNA (Schöch et al, 1988a), die unter 3.1.4. näher erläutert wird, erfolgte unter Verwendung publizierter Nucleotidsequenzen von tRNAs (Sprinzl et al, 1985). Darüber hinaus wurden die relativen Häufigkeiten der 61 "Sinn"-Codons in 39 Protein-codierenden Genen des Menschen berücksichtigt (Ikemura, 1985; Maruyama et al, 1986). Dazu wurde postuliert, daß die relative Häufigkeit des Vorkommens einer definierten tRNA-Spezies mit einem definierten Anticodon von der relativen Häufigkeit des zugehörigen Codons (bzw. unter Berücksichtigung des "Wobble" der entsprechenden Codons) in den 39 Genen abhängt.

Dieses Vorgehen stützt sich auf den Befund, daß zwischen der Häufigkeit des Vorkommens einer tRNA-Spezies mit einem bestimmten Anticodon und der Häufigkeit der Benutzung der entsprechenden Codons in Protein-codierenden Genen ein Zusammenhang besteht. Eine derartige Korrelation

Tabelle 1:

Für cytoplasmatische tRNA bei "Säugetern" berechnete durchschnittliche Verteilung von Nucleosiden (nach Schöch et al, 1988a; Erläuterungen siehe Text)

Rang	Nucleosid	durchschnittliche Anzahl Reste pro tRNA	bei "Säugetern" spezifisch für tRNA
1	G	21.71	nein
2	C	19.28	nein
3	A	12.85	nein
4	U	10.11	nein
5	γ^*	3.02	nein
6	D	2.61	ja
7	m ^o C	1.28	nein
8	m ⁺ A	0.886	nein
9	m ² G	0.765	nein
10	m ^o U	0.584	ja
11	m ⁺ G	0.519	ja
12	<u>m²G</u>	0.501	ja
13	m ² G	0.438	nein
14	Um	0.349	nein
15	I	0.334	ja
16	Gm	0.245	nein
17	<u>t^oA</u>	0.224	ja
18	m ^o C	0.218	ja
19	Cm	0.202	nein
20	ac ^o C	0.171	nein
21	m ^o Um	0.133	ja
22	i ^o A	0.116	ja
23	mcm ^o s ² U	0.106	ja
24	γ_m^*	0.105	nein
25	m ⁺ I	0.068	(ja)*
26	Q	0.062	ja
27	manQ	0.051	ja
28	o ₂ yW	0.044	ja
29	acp ^o U	0.038	ja
30	mt ^o A	0.029	ja
31	ms ² t ^o A	0.024	ja
32	cm ^o U	0.016	(ja)*

* m⁺I wurde bisher bei Eukaryonten nur in tRNAs von Hefen und Bombyx mori, cm^oU nur in tRNAs von Hefen beschrieben (Sprinzl et al, 1987).

konnte bei den einzelligen Organismen *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden (Ikemura, 1982; Ikemura, 1985; Watson et al, 1987). Aber auch für mehrzellige Organismen gibt es Hinweise auf eine Adaptation von tRNA-Populationen an Codon-Häufigkeiten. So wurde bei der Seidenraupe *Bombyx mori* für den hinteren Teil der Seidendrüse, der große Mengen Fibroin (46 % Glycin, 29 % Alanin, 12 % Serin) erzeugt, gezeigt, daß eine quantitative Adaptation von tRNA-Isoakzeptoren für Glycin, Alanin und Serin an die Codon-Häufigkeiten in der Fibroin-mRNA besteht (Garel, 1976; Chevallier & Garel, 1979; Hentzen et al, 1981; Chevallier & Garel, 1982; Garel, 1982). Eine gute Korrelation wurde auch zwischen der Frequenz der Codons für Alanin, Glycin, Leucin und Serin in 6 verschiedenen mRNAs tierischer Herkunft einerseits und der Häufigkeit des Vorkommens entsprechender tRNA-Spezies andererseits gefunden (Chavancy et al, 1979).

Eine Beschränkung bei der Berechnung der Codon-Häufigkeiten auf nur 39 menschliche Gene (Schöch et al, 1988a) ist deshalb möglich, weil für die Codon-Frequenz im mehrzelligen Organismus ein charakteristisches Muster besteht, das bereits bei einer Analyse von mindestens 10 Genen, die Proteine verschiedener Funktionen codieren, deutlich wird (Ikemura, 1985). Dieses charakteristische Muster, das durch die Bevorzugung bestimmter Vertreter unter den 61 "Sinn"-Codons entsteht, ist innerhalb der bisher dokumentierten Säuger weitgehend gleich (Ikemura, 1985; Maruyama et al, 1986).

Aus Tabelle 1 wird deutlich, daß Ψ und D (Rang 5 und 6) die häufigsten modifizierten Nucleoside sind, gefolgt von insgesamt 7 am Basenring methylierten Nucleosiden (Rang 7 - 13). Während die an der Ribose methylierten Nucleoside Positionen im mittleren Bereich der Tabelle einnehmen, zeigt die Rangfolge der "hypermodifizierten" Nucleoside, mit Ausnahme von t⁶A (Rang 17), im unteren Bereich der Tabelle, daß diese im Durchschnitt relativ selten in cytoplasmatischer tRNA vorkommen.

Die Kenntnis des durchschnittlichen Vorkommens modifizierter Nucleoside in den einzelnen RNA-Klassen ist eine Grundvoraussetzung für die Interpretation dieser Bausteine als Umsatzmarker von RNA (1.3.; Sander et al, 1984; Sander et al, 1986 a,b).

Streng genommen läßt sich aus der Ausscheidung modifizierter RNA-Bausteine immer nur auf den Abbau von deren Herkunftsmolekülen rückschließen. Hier wird unter der Modellannahme von steady state-Bedingungen anstelle von Abbau stets von Umsatz gesprochen.

Zum Rückschluß von der Ausscheidung modifizierter RNA-Kataboliten auf Abbau bzw. Umsatz von RNA müssen weitere Bedingungen erfüllt sein. So ist z.B. wichtig, daß in einzelnen RNA-Klassen für diese jeweils spezifische modifizierte Nucleoside vorkommen. Dies ermöglicht es, die Umsätze der einzelnen RNA-Klassen getrennt zu beurteilen. Andererseits müssen als Voraussetzung für derartige Umsatzberechnungen nicht unbedingt in jeder RNA-Klasse spezifische modifizierte Nucleoside enthalten sein. Notwendig ist nur die Kenntnis der Anteile des betrachteten Nucleosids in denjenigen RNA-Klassen, in denen es vorkommt. Dieser Aspekt wird an späterer Stelle (s. S. 19 - 20) ausführlich erläutert.

In der rechten Spalte von Tabelle 1 sind diejenigen modifizierten Nucleoside gekennzeichnet, die bei Säugern für tRNA spezifisch sind. Dies sind die Nucleoside m¹G, m₂²G und t⁴A (in Tab. 1 unterstrichen), zu deren Ausscheidung in dieser Arbeit Untersuchungen vorgelegt werden, sowie die meisten in Tabelle 1 dargestellten "hypermodifizierten" Nucleoside.

In Tabelle 2 ist die durchschnittliche Häufigkeit modifizierter Nucleoside in cytoplasmatischer rRNA von Säugern dargestellt (Schöch et al, 1988a).

Ψ ist (wie in tRNA) auch in cytoplasmatischer rRNA das am häufigsten vorkommende modifizierte Nucleosid. Die Angaben für die Zahl der Ψ-Reste pro 28S und 18S RNA sind Durchschnittswerte. Sie wurden anhand von Daten über Ψ-Gehalte in rRNA aus HeLa- bzw. Maus-L-Zellen gemittelt (Hughes & Maden, 1978). Allerdings unterscheiden sich die Ψ-Gehalte in diesen Zellen nicht wesentlich. So beträgt die Zahl der Ψ-Reste in rRNA (28S + 18S RNA) aus HeLa-Zellen durchschnittlich 96 und aus Maus-L-Zellen 90. In kultivierten Nieren-Zellen des phylogenetisch den Säugern ferner stehenden Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) liegt der Ψ-Gehalt in rRNA (28S + 18S) mit 111 Resten etwas höher als die entsprechenden Ψ-Gehalte in den von Hughes & Maden (1978) untersuchten Säugerzellen.

Als nächsthäufige modifizierte Bausteine nach Ψ kommen in cytoplasmatischer rRNA von Säugern 2'-O-Methylribonucleoside vor (Rang 2-5 in Tab. 2). Von den restlichen, meist am Basenring modifizierten Nucleosiden (Rang 6-14) finden sich pro 285 + 185 + 5.85 RNA jeweils nur ein bis zwei Reste (Khan et al, 1978; Thomas et al, 1978).

Tabelle 2:

Modifizierte Nucleoside in cytoplasmatischer rRNA bei Säugern (nach Schöch et al, 1988a)

Rang	Nucleosid	<u>Anzahl der Reste in</u>			Σ	bei Säugern spezifisch für rRNA
		285 RNA	185 RNA	5.85 RNA		
1	Ψ	~55	~38	2	~95	nein
2	Gm	21.5	9	1	31.5	nein
3	Am	18.5	13	-	31.5	nein
4	Cm	14.5	6.5	-	21	nein
5	Um	8	10.5	0.3	19	nein
6	m ₂ ² A	-	2	-	2	ja
7	m ⁶ A	1	1	-	2	nein
8	m ⁵ C	2	-	-	2	nein
9	ac ⁴ C	-	1	-	1	nein
10	m ² U	1	-	-	1	ja
11	Ψ m	1	-	-	1	nein
12	am Ψ	-	1	-	1	ja
13	m ¹ A	1	-	-	1	nein
14	m ⁷ G	-	1	-	1	nein

- : nicht gefunden

Dabei sind untersuchte rRNAs von Säugern (aus HeLa-, Maus-L- und Hamster-BHK/C13-Zellen) jeweils in gleichen Positionen innerhalb der rRNA-Moleküle fast ausnahmslos mit identischen methylierten Nucleosiden besetzt. Selbst bei einem Vergleich der rRNAs (285 + 185 + 5.85) aus kultivierten Nierenzellen von *Xenopus laevis* (s. S. 7) mit rRNA

aus HeLa-Zellen zeigt sich, daß die rRNAs in beiden Fällen zu ungefähr 95 % in gleicher Weise methyliert sind (Khan et al, 1978). Die weitgehende Übereinstimmung der Methylierungsmuster in rRNA aus verschiedenen Zelltypen verschiedener Vertebraten zeigt, daß dieses Methylierungsmuster innerhalb phylogenetisch nicht allzu fern stehender Organismen weitgehend konserviert wurde, unabhängig von der Art des Gewebes oder der Wachstumsrate der Zellen (Maden, 1986).

Aus Tabelle 2 ist weiterhin zu entnehmen, daß nur 3 der dort aufgeführten modifizierten Bausteine soweit bekannt bei Säugern für cytoplasmatische rRNA spezifisch sind. Zu diesen drei spezifischen modifizierten Nucleosiden gehört m³U, dessen Ausscheidung einer der Gegenstände dieser Arbeit ist.

Als letztes Beispiel für das Vorkommen modifizierter Nucleoside in RNA soll die Klasse der "small nuclear" URNAs besprochen werden. Die Benennung URNA erfolgte wegen des hohen Uridylsäure-Gehaltes dieser RNAs (Busch et al, 1982). Bisher konnten aus höheren Eukaryonten insgesamt 10 verschiedene URNAs (U1-U10) isoliert werden (Reddy et al, 1985). U1- bis U6-RNAs sind im Zellkern (U3 im Nucleolus) lokalisiert, wo sie als Bestandteile von Ribonucleoprotein-Partikeln (snRNPs) beim sogenannten "Processing" von Vorläufer-mRNA und möglicherweise auch von Vorläufer-rRNA (im Fall von U3-RNA) beteiligt sind (Reddy et al, 1985; Watson et al, 1987). Die exakte Lokalisation der neuerdings entdeckten U7- bis U10-RNAs innerhalb des Zellkerns ist noch nicht eindeutig geklärt (Reddy et al, 1985).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal der bisher identifizierten URNAs (mit Ausnahme von U6-RNA) ist das Vorkommen eines trimethylierten Guanosins (m³,²,⁷G) in einer "Cap-Struktur" am 5'-Ende (Reddy et al, 1985). In diesen URNA-typischen "Cap-Strukturen" folgen auf das m³,²,⁷G, das über ein Triphosphat mit dem 5'-Ende der jeweiligen URNA verestert ist, ein bis zwei in der 2'-O-Position der Ribose methylierte Nucleoside, wobei sich in der ersten Position nach dem m³,²,⁷G immer ein an der Ribose methyliertes Adenosin befindet. Das "Cap"-Nucleosid am 5'-Ende von U6-RNA konnte bisher noch nicht identifiziert werden (Reddy, 1986).

Bisher verfügbare Sequenzanalysen von URNAs machen es wahrscheinlich, daß die Nucleotid-Sequenzen einander entsprechender URNAs von höheren Wirbeltieren unabhängig von den Geweben, denen sie entstammen, weitgehend konstant sind. So stimmen die Nucleotid-Sequenzen der U1-RNAs aus Geweben von Mensch, Ratte und Huhn zu über 95 % überein (Busch et al, 1982; Reddy, 1986).

In Tabelle 3 sind die Häufigkeiten des Vorkommens modifizierter Nucleoside in bisher beschriebenen URNAs aus Geweben von höheren Wirbeltieren (Mensch, Ratte, Maus und Huhn) gezeigt.

Tabelle 3:

Modifizierte Nucleoside in URNAs (nach Schöch et al, 1988a)

Nucleosid	<u>Anzahl der Reste in</u>								spezifisch für URNAs
	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	
Ψ	2	12	2	3	3	3	+	-/1	nein
Am	2	1	2	2	1	3	+	1	nein
Em	-	2	-	1	1	4	+	-	nein
Gm	-	4	-	1	1	1	-	-	nein
Um	1	2	-	-	2	-	-	1	nein
m ₃ ² , 2', 2'G	1	1	1	1	1	-	+	1	ja
m ⁶ A	-	-	-	1	-	1	+	-	nein
m ⁶ Am	-	1	-	-	-	-	-	-	nein
m ² G	-	-	-	-	-	1	-	-	nein

- : nicht gefunden

+ : 0.3 - 0.8 Reste pro mol nach Reddy et al (1985)

Die in der Tabelle aufgeführten modifizierten Nucleoside in U1-, U4- und U5-RNAs kommen in entsprechenden URNAs aus Geweben von Mensch, Ratte, Maus und Huhn vor. Allerdings sind die Angaben zum Vorkommen von m⁶A in U4-RNA widersprüchlich (Busch et al, 1982; Reddy, 1986). Daten über die Häufigkeit modifizierter Nucleoside in U2-, U3- und U6-RNAs

entstammen ausschließlich Sequenzanalysen von URNAs aus Geweben der Ratte (U2- und U3-RNA) bzw. der Ratte und der Maus (U6-RNA), da für diese URNAs keine weiteren kompletten Sequenzanalysen vorliegen (Reddy, 1986). Angaben über das Vorkommen von Ψ in sequenzierter U8-RNA aus Ratten- bzw. Maus-Gewebe sind widersprüchlich (Reddy et al, 1985; Reddy, 1986) und deshalb in Tabelle 3 als "-/1" dargestellt. Für U9 und U10 fehlen vollständige Sequenzanalysen. Wie die äußere rechte Spalte zeigt, ist $m_3^{2,2,76}$ das einzige nach derzeitigem Kenntnisstand für die Klasse der URNAs spezifische Nucleosid.

Die bisher erläuterte Verteilung modifizierter RNA-Bausteine bezieht sich auf reife RNA-Moleküle. Angaben bezüglich des Modifizierungsgrades der RNA-Abschnitte in Vorläufer-RNA-Molekülen, die während des "Processing" zu reifen RNAs eliminiert werden, machen es wahrscheinlich, daß ein eventueller Anteil an der Gesamtausscheidung modifizierter Nucleoside aus diesen RNA-Bereichen gering ist. So konnte gezeigt werden, daß sich in den "transkribierten Spacer-Abschnitten" von 45S-Vorläufer-rRNA aus HeLa-Zellen, die bei der Reifung zu 28S, 18S und 5.8S rRNA eliminiert werden, keine methylierten Nucleoside befinden (Maden & Salim, 1974; Björk, 1984). Auch "transkribierte Spacer-Abschnitte" in 37S Vorläufer-rRNA (der gemeinsame Vorläufer von reifer 26S, 17S und 5.8S rRNA) aus *Saccharomyces carlsbergensis* enthalten wahrscheinlich keine bzw. möglicherweise nur eine sehr geringe Anzahl an Ψ -Resten, während in den reifen rRNAs (26S + 17S + 5.8S) aus diesem Organismus insgesamt 36-37 Ψ -Reste vorhanden sind (Brand et al, 1979). Allerdings kann aufgrund früherer Versuche, bei denen die Nucleotid-Zusammensetzung von 45S Vorläufer-rRNA aus HeLa-Zellen mit der Zusammensetzung von reifer 28S und 18S RNA verglichen wurde (Jeanteur et al, 1968), nicht ausgeschlossen werden, daß bei höheren Organismen die "transkribierten Spacer-Regionen" einige Ψ -Reste enthalten. Der anhand dieser Daten berechenbare, nicht auf reife rRNA entfallende Ψ -Anteil liegt im Bereich von maximal 25 % der gesamten Ψ -Menge, die in 45S-Vorläufer-RNA bestimmt wurde.

In Vorläufer-tRNAs von Eukaryonten kommen ebenfalls transkribierte RNA-Abschnitte vor, die bei der Reifung eliminiert werden. Diese Abschnitte befinden sich am 5'-Ende ("Leader") bzw. am 3'-Ende ("Trailer") von

Vorläufer-tRNAs, ferner, durch 1 bis 2 weitere Nucleotide getrennt, als "intervening sequence" (Intron), auf das 3'-Ende des Anticodons folgend (Hopper, 1984). Das Vorhandensein von Introns in entsprechenden Vorläufer-tRNAs scheint allerdings auf solche tRNAs beschränkt zu sein, die mit Phe, Tyr, Ser, Leu, Ile, Trp, Pro und Lys beladbar sind (Watson et al, 1987). Analysen der Nucleotid-Zusammensetzung von tRNA^{Tyr}- und tRNA^{Phe}-Vorläufern aus *Saccharomyces cerevisiae* haben gezeigt, daß die jeweils 14 bzw. 18-19 Nucleotide umfassenden Introns keine modifizierten Nucleoside enthalten (Knapp et al, 1978; Johnson & Abelson, 1983). Nach Injektion eines klonierten tRNA^{Tyr}-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* in Kerne von *Xenopus laevis*-Oocyten konnten Nishikura & De Robertis (1981) einzelne Schritte bei der Reifung von transkribierter Vorläufer-tRNA^{Tyr} verfolgen. Dabei beobachteten sie weder modifizierte Nucleoside in der 5'-"Leader"-Region (13 Nucleotide) noch in der 3'-"Trailer"-Region (2 Nucleotide) bzw. im Intron (14 Nucleotide), während die reife tRNA (bis auf ein Gm) alle modifizierten Nucleoside enthielt, die in der entsprechenden reifen *Saccharomyces*-tRNA vorhanden sind.

Obwohl die hier dargestellten Beispiele sicherlich kein vollständiges Bild der möglichen Modifikationen in "Spacer"-Abschnitten von Vorläufer-RNAs ergeben, lassen sie doch vermuten, daß diese RNA-Abschnitte weitgehend frei von modifizierten Nucleosiden sind.

1.2. Stoffwechsel modifizierter RNA-Bausteine bei Säugern

Die Synthese der modifizierten Nucleoside der RNA findet während der Reifung auf dem Polynucleotid-Niveau statt, indem Standard-Nucleoside enzymatisch modifiziert werden (Fleissner & Borek, 1962; Kline & Söll, 1982; Björk, 1984). Von dieser Regel gibt es eine bekannte Ausnahme, nämlich die Synthese von Q (Queuosin) in tRNA, bei der in einer Transglycosylierungs-Reaktion ein komplettes Guanin durch Queuin (die Nucleobase von Queuosin) bzw. bei Eubakterien durch einen Vorläufer des Queuins ausgetauscht wird (Okada et al, 1979; Shindo-Okada et al, 1980; Kline & Söll, 1982; Katze et al, 1984).

Die folgende kurze Beschreibung der Synthese modifizierter Nucleoside

soll auf methylierte Nucleoside, Ψ und t^*A begrenzt bleiben, da nur deren Ausscheidung in der vorliegenden Arbeit behandelt wird.

Bei der Synthese methylierter Nucleoside erfolgt die Übertragung der Methylgruppen durch Methyltransferasen, wobei allgemein S-Adenosylmethionin als Methylgruppen-Donator fungiert (Mandel & Borek, 1963; Borek & Srinivasan, 1966; Söll & Kline, 1982). Allerdings konnte gezeigt werden, daß grampositive Bakterien N^5, N^{10} -Methylentetrahydrofolsäure als Methylgruppen-Donator zur Synthese von m^5U (Ribothymidin) in tRNA verwenden (Kersten et al, 1975; Delk & Rabinowitz, 1975; Kersten, 1984).

Bei der Synthese von Ψ wird die N-glycosidische Bindung zwischen Base und Ribose (wie beim Austausch von Gua gegen Queuin) gespalten. Darauf folgt eine Rotation des ursprünglich vorhandenen Uracils und die Bildung einer C-C-Bindung zwischen dem C-5 des Pyrimidinringes und dem C-1 der Ribose (s. Abb. 3, S. 21). Über die Pseudouridin-Synthetasen, die diese Reaktion in den unterschiedlichen Positionen der verschiedenen RNAs katalysieren, ist bisher wenig bekannt (Kline & Söll, 1982).

Für das Adenosin-Derivat t^*A (in tRNA) konnte mit einem teilweise gereinigten Enzym aus *E. coli* und t^*A -defizienter tRNA als Substrat in vitro gezeigt werden, daß Bicarbonat und L-Threonin zur Synthese der Seitenkette (s. Abb. 3, S. 21) verwendet werden (Elkins & Keller, 1974; Kline & Söll, 1982).

Unmodifizierte Nucleotide, die beim Abbau von RNA im Zuge des normalen RNA-Umsatzes freigesetzt werden, können z.T. direkt, z.T. von verschiedenen Stufen der Purin- und Pyrimidin-Abbauwege aus zu Ribonucleosid-5'-triphosphaten regeneriert und somit zur RNA-Synthese wiederverwendet werden. Ein Teil der beim RNA-Abbau anfallenden unmodifizierten Nucleotide wird weiter katabolisiert, wobei beim Menschen Harnsäure das Endprodukt des Purinabbaus, β -Alanin das Hauptprodukt des Abbaus von Cytosin und Uracil ist (Fox, 1981; Zöllner, 1982; Barankiewicz et al, 1982; Peters & Veerkamp, 1983; Moyer et al, 1985). β -Alanin kann weiter zu Acetat abgebaut bzw. zur Synthese der Dipeptide Carnosin und Anserin (beim Menschen nur des Carnosins) verwendet werden.

Beim Abbau von RNA freigesetzte modifizierte Nucleotide werden offenbar sehr schnell dephosphoryliert (Lothrop & Uziel, 1982). Die modifizierten Nucleoside werden in der Regel nicht rephosphoryliert, da entsprechende Kinasen fehlen (Waalkes & Borek, 1976; Lothrop & Uziel, 1982 und 1983; Borek et al, 1983; Borek, 1984 und 1985). Dies verhindert, daß modifizierte Nucleoside in Vorläuferpolynucleotide eingebaut werden, was in Anbetracht der bekannten Eigenschaften der RNA-Polymerasen mutmaßlich unspezifisch erfolgen würde. DNA-Abschnitte, die unmittelbar in colineare RNA-Abschnitte mit modifizierten Nucleotiden transkribiert würden, sind nicht bekannt. Demnach werden Ribonucleotide prinzipiell nur posttranskriptional modifiziert bzw. können beim Abbau von RNA freiwerdende modifizierte Nucleoside nicht zur Neusynthese von RNA verwendet werden. Diese Aussage wird zusätzlich dadurch gestützt, daß hochspezifische Enzyme bekannt sind, die RNA posttranskriptional modifizieren, und daß, wie Sequenzanalysen gereinigter RNA-Moleküle gezeigt haben, alle Modifikationen in streng definierten Positionen erfolgen (Schöch & Heller-Schöch, 1977; Sprinzl et al, 1987).

Von der Regel, daß modifizierte Ribonucleoside (bzw. modifizierte Ribonucleosid-5'-monophosphate) nicht wiederverwendet werden, wurden bei Säugern zwei Ausnahmen beschrieben. So diskutieren Lothrop & Uziel (1982), daß bei Hamster-Embryo-Fibroblasten aus dem RNA-Abbau stammendes mFU (Ribothymidin) zur Synthese von dT (Desoxythymidin) bzw. dTXP (Desoxythymidinphosphaten) wiederverwendet werden kann. Ferner konnten Gündüz & Katze (1984) im zellfreien Extrakt einer Zelllinie aus Affen-Niere eine Aktivität nachweisen, die Queuosin-5'-phosphat in Queuin überführt, welches wiederum die Vorstufe für die Synthese von Queuosin in tRNA darstellt.

Modifizierte RNA-Kataboliten lassen sich somit, von wenigen Ausnahmen abgesehen, als "Einweg-Kataboliten" charakterisieren (Schöch et al, 1983 und 1988b). Neben den bereits genannten zwei Voraussetzungen (bekannte Häufigkeit in einzelnen RNA-Klassen, RNA-Klassen-spezifische Herkunft einzelner RNA-Kataboliten), ist der Einweg-Katabolitencharakter eine dritte Grundvoraussetzung dafür, daß aus der Ausscheidung von modifizierten RNA-Kataboliten im Urin Rückschlüsse auf den Umsatz ihrer Herkunfts-RNA-Moleküle gezogen werden können.

Eine vierte unerläßliche Voraussetzung für die Eignung modifizierter RNA-Kataboliten als "RNA-Umsatzmarker" besteht darin, daß diese Substanzen nach dem Abbau der RNA nicht weiter (d.h. über die Stufe des modifizierten Nucleosids bzw. der zugehörigen modifizierten Nucleobase hinaus) verstoffwechselt werden. Als fünfte Bedingung muß eine quantitative Ausscheidung in das Medium, in dem die modifizierten RNA-Kataboliten bestimmt werden sollen (z.B. Zellkulturmedium, Urin bei Säugern), erfolgen. Für drei modifizierte RNA-Kataboliten konnte eine weitgehend quantitative Ausscheidung im Urin von Säugern bereits gezeigt werden:

Pseudouridin, das (bis auf mRNA) in allen RNA-Klassen (s. Tab. 1-3, S. 5, 8 u. 10) vorkommt, wird von Mensch und Ratte nicht verstoffwechselt und quantitativ im Urin ausgeschieden (Weissman et al, 1962; Dugaiczyk & Eiler, 1966).

Für t⁴A wurde gleichfalls bei Mensch und Ratte quantitative Ausscheidung im Urin beschrieben (Hong et al, 1973).

m⁷G wird offenbar im wesentlichen als freie Base m⁷Gua ausgeschieden (s. u.). Craddock et al (1968) konnten bei der Ratte eine fast vollständige Ausscheidung von m⁷Gua zeigen. Die Autoren fanden ~95 % von i.p. injiziertem m⁷Gua im Urin wieder, beobachteten jedoch auch eine geringfügige Demethylierung. Im Gegensatz zum Menschen, bei dem ein Teil des m⁷Gua anscheinend durch eine Xanthin-Oxidase in 8-Hydroxy-7-methylguanin umgewandelt und im Urin ausgeschieden wird (Litwack & Weissmann, 1966; Skupp & Ayvazian, 1969), scheidet die Ratte kein 8-Hydroxy-7-methylguanin aus (Mandel et al, 1966).

Einige modifizierte Ribonucleoside werden in vivo durch Abspaltung der Ribose in unterschiedlichem Ausmaß in die entsprechenden modifizierten Nucleobasen überführt. Dementsprechend werden entweder diese modifizierten Ribonucleoside zusammen mit den entsprechenden Nucleobasen oder nur modifizierte Nucleobasen ausgeschieden, soweit letztere nicht in erheblichem Umfang weiter verstoffwechselt werden. Im Falle von m⁷Gua konnten Mrochek et al (1974) nachweisen, daß das zugehörige Nucleosid m⁷G im Human-Urin nicht ausgeschieden wird, was eine vollständige Abspaltung der Ribose vermuten läßt. Kulikowska et al (1986)

zeigten, daß m⁷G in vitro durch eine Purin-Nucleosid-Phosphorylase aus Kälbermilz in einer unter den Bedingungen dieser Autoren irreversiblen Reaktion phosphorolytisch gespalten wird.

Im folgenden werden modifizierte RNA-Kataboliten aufgeführt, für die eine Verstoffwechselung bei Säugern beschrieben wurde. Das in tRNA neben dem Anticodon vorkommende N⁶-(Δ²-Isopentenyl)adenosin (IPAR) wird beim Menschen nach intravenöser Gabe fast vollständig verstoffwechselt. Nach Chheda & Mittelman (1972) absorbierten etwa 50 % der Folgeprodukte kein UV-Licht, was die Autoren auf eine mögliche Sättigung bzw. Spaltung des Purinringes zurückführten. Nach intravenöser Gabe von IPAR isolierten andererseits Rustum & Schwartz (1974) aus Rattenleber sowohl bis zum Triphosphat gehende Phosphorylierungsprodukte von IPAR, als auch N-Dealkylierungsprodukte wie Adenosin, AMP, ADP und ATP. Eine Reproduktion dieser Ergebnisse ist allerdings nicht bekannt.

Bei E. coli wurde ein Abbau von N⁶-Methyladenin zu Hypoxanthin beschrieben (Remy, 1961). In einem partiell gereinigten Präparat von Adenosin-Desaminase aus menschlichen Erythrozyten hemmte N⁶-Methyladenosin die Desaminierung von Adenosin kompetitiv, wurde selbst jedoch nur schwach umgesetzt (Agarwal et al, 1975). Der Befund, daß kein bzw. allenfalls geringe Mengen von m⁶A in menschlichem Urin ausgeschieden werden (Uziel et al, 1976; Gehrke & Kuo, 1985; Schöch et al, 1988a), obwohl zwei m⁶A-Reste pro rRNA (s. Tab. 2, S. 8) und durchschnittlich ein bis zwei m⁶A-Reste pro mRNA vorkommen (Moss, 1984), spricht allerdings für eine weitgehende Verstoffwechselung von N⁶-Methyladenosin beim Menschen (auch die zugehörige Nucleobase N⁶-Methyladenin wurde in Human-Urin nicht gefunden, eigene unveröffentlichte Ergebnisse).

Erst kürzlich konnten Dutta & Chheda (1987) zeigen, daß bei Ratten intravenös injiziertes 1-Methyladenosin zu ungefähr 57 % unverändert im Urin ausgeschieden wird, während ungefähr 4.5 % in 1-Methylinosin und 33 % in 1-Methylhypoxanthin umgewandelt werden. Daraus ziehen die Autoren den Schluß, daß 1-Methyladenosin vermutlich durch eine Adenosin-Desaminase zu 1-Methylinosin desaminiert und anschließend die Ribose durch eine Nucleosid-Phosphorylase abgespalten wird. Eine Verstoffwechselung von 1-Methyladenosin wurde auch aufgrund der ausgeschiede-

nen Mengen im Urin, die deutlich niedriger liegen als aus dem Abbau von tRNA und rRNA zu erwarten wäre, postuliert (Sander et al, 1986a; Schöch et al, 1988a). Beim Menschen ist anscheinend 1-Methylinosin das Hauptumwandlungsprodukt (Sander et al, 1986a). Es wird im Urin in beträchtlicher Menge gefunden, kommt in RNA aber kaum vor (durchschnittlich 0.068 Reste pro tRNA; Tab. 1, S. 5; Schöch et al, 1988a).

Abschließend seien die besprochenen Voraussetzungen noch einmal zusammengefaßt, die erfüllt sein müssen, um bei Säugern aus der Ausscheidung modifizierter RNA-Kataboliten Rückschlüsse auf den Umsatz von deren Herkunfts-RNA-Molekülen ziehen zu können:

1. bekannte Häufigkeit des Vorkommens in RNA;
2. Spezifität einzelner modifizierter Nucleoside für bestimmte RNA-Klassen;
3. freigesetzte modifizierte Nucleoside dürfen nicht wiederverwendet werden ("Einweg-Kataboliten");
4. modifizierte Nucleoside (bzw. zugehörige Nucleobasen) dürfen nicht verstoffwechselt werden;
5. modifizierte Nucleoside (Nucleobasen) müssen quantitativ im Urin ausgeschieden werden.

1.3. Deutung von modifizierten RNA-Kataboliten im Urin als Indikatoren für den RNA-Umsatz

Die Untersuchung der Ausscheidung modifizierter RNA-Kataboliten erlangte zuerst ein breiteres Interesse im Zusammenhang mit malignem Wachstum, weil bei einigen Neoplasien bzw. in bestimmten Stadien von Neoplasmen eine deutlich erhöhte Ausscheidung modifizierter RNA-Bausteine beobachtet wurde. Eine derartige erhöhte Ausscheidung ist wahrscheinlich auf einen verstärkten Abbau von RNA-Molekülen zurückzuführen (Borek, 1985). Eine erhöhte Ausscheidung modifizierter RNA-Kataboliten ist vermutlich primär nur sehr selten das Resultat eines (in malignem Gewebe vorkommenden) veränderten Ausmaßes an Modifikationen von RNA bzw. eines veränderten Modifikationsmusters. Im Falle von tRNA sind derartige Unterschiede in den Modifikationen zwischen normalen und malignen Geweben vereinzelt beschrieben worden (Dirheimer, 1983; Borek, 1984; Borek,

1985; Sprinzel et al, 1987). Diese "falschen" Modifikationen könnten nach Borek u. U. sekundär eine Ursache für einen verstärkten Abbau von RNA darstellen.

Veränderte Ausscheidungsmuster modifizierter RNA-Kataboliten wurden zur Diagnose und zur Verlaufsbeurteilung von Malignomen herangezogen (Schöch & Heller-Schöch, 1977; Thomale & Nass, 1982; Borek et al, 1983; Thomale et al, 1983; Müller et al, 1983; Russo et al, 1984; Borek, 1985; Cimino et al, 1985; Nass et al, 1985), ferner zur ergänzenden Beurteilung des Therapieerfolges bei der Behandlung von Malignomen (Schöch & Heller-Schöch, 1977; Schöch et al, 1979; Speer et al, 1979; Trewyn et al, 1982; Müller et al, 1983; Sharma et al, 1983; Salvatore et al, 1983; Heldman et al, 1983; Borek, 1984; Buhl et al, 1985).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie bei Personen, die an AIDS erkrankt waren, fanden Borek et al (1986) eine stark erhöhte Ausscheidung modifizierter Nucleoside. Auch bei symptomfreien, HTLV-III-Virus-positiven Personen konnten die Autoren eine deutlich erhöhte Ausscheidung modifizierter Nucleoside feststellen. Bei einem Vergleich der Ausscheidungswerte modifizierter RNA-Kataboliten von Rauchern mit denjenigen von Nichtrauchern zeigte sich nur ein geringfügiger Unterschied (Apell et al, 1986).

Eine erhöhte Ausscheidung methylierter Guaninderivate beobachteten Schöch & Heller-Schöch (1977) auch bei Kindern, die an fieberhaften Infekten erkrankt waren. Ein generell erhöhter RNA-Umsatz scheint also nicht nur bei vielen Neoplasien, sondern auch im Verlauf von Infektionen aufzutreten.

Bei der Erstellung von Normalwerten für die Ausscheidung methylierter Guaninderivate aus RNA beim Menschen stellten Schöch & Heller-Schöch (1977) fest, daß die ausgeschiedenen Mengen altersabhängig sind (ausführlich dargestellt in Schöch et al, 1981), wobei die höchsten Ausscheidungswerte pro Gewichtseinheit bei jungen Säuglingen gefunden werden. Dieser altersbezogene Unterschied in der Ausscheidung konnte auch für das modifizierte Nucleosid Ψ beobachtet werden (Topp et al, 1986). Die verstärkte Ausscheidung modifizierter RNA-Kataboliten läßt auf ei-

nen generell höheren RNA-Umsatz bei jungen Kindern schließen (Schöch & Heller-Schöch, 1977).

In neuerer Zeit konnte die Arbeitsgruppe von Schöch zeigen, daß es möglich ist, durch Zuordnung bestimmter, aufgrund vorliegender Befunde nachweislich bzw. vermutlich quantitativ ausgeschiedener RNA-Kataboliten zu einzelnen RNA-Klassen Aussagen über deren jeweiligen Umsatz im Ganzkörper zu machen (Sander et al, 1986a,b). Die für diese Berechnungen bisher verwendete Zuordnung modifizierter RNA-Kataboliten zu bestimmten RNA-Klassen bei Säugern ist im linken Teil von Tabelle 4 dargestellt (Schöch et al, 1988b). Im rechten Teil der Tabelle sind modifizierte RNA-Bausteine aufgeführt, die in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu m_2^2G , Ψ und m^7G untersucht wurden (vgl. Studienaufbau, 1.4.).

Tabelle 4:

Vorkommen modifizierter Nucleoside in tRNA, rRNA und mRNA bei Säugern

Vorkommen in	modifizierte Nucleoside						
	m_2^2G	Ψ	m^7G	t^6A	m^1G	m^2G	m^3U
tRNA	+	+	+	+	+	+	-
rRNA	-	+	+	-	-	-	+
mRNA	-	-	+	-	-	-	-

Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, ist m_2^2G (Abb. 3, S. 21) bei Säugern für tRNA spezifisch. Daher läßt sich aus der Ausscheidung von m_2^2G direkt auf den Abbau von tRNA rückschließen.

Die Tabelle zeigt ferner, daß Ψ (Abb. 3, S.21) sowohl in tRNA als auch in rRNA vorkommt. Aufgrund des bekannten durchschnittlichen Mengenverhältnisses von $m_2^2G : \Psi$ in tRNA (s. Tab. 1, S. 5) kann der auf

tRNA entfallende Ψ -Anteil im Urin über die ausgeschiedene m^2G -Menge berechnet werden. Das restliche Ψ kann dem Abbau von rRNA zugeordnet werden, da der Anteil des aus URNA stammenden Ψ vernachlässigbar sein dürfte (Sander et al, 1986a). Somit ergibt sich die Gleichung:

$$\Psi_{rRNA} = \Psi_{\text{gesamt}} - \Psi_{tRNA} \text{ (Schöch et al, 1988a).}$$

Für ausgeschiedenes m^7Gua (Abb. 3, S. 21), das in allen drei gezeigten RNA-Klassen vorkommt (Tab. 4, S. 19), läßt sich aus dem bekannten durchschnittlichen Verhältnis von $m^2G : m^7G$ in tRNA (Tab. 1, S. 5) über die Messung der für tRNA spezifischen Ausscheidung von m^2G derjenige Anteil von m^7Gua im Urin berechnen, der sich dem Abbau von tRNA zuordnen läßt. Ebenso kann man aufgrund des bekannten durchschnittlichen Mengenverhältnisses von $\Psi : m^7G$ in rRNA (s. Tab. 2, S. 8) denjenigen Anteil von m^7Gua im Urin errechnen, der sich dem rRNA-Umsatz zuordnen läßt. Der Ψ -Anteil im Urin aus dem rRNA-Abbau wurde zuvor wie oben beschrieben ermittelt. Zieht man von der Gesamtausscheidung an m^7Gua die aus tRNA und rRNA stammenden Anteile ab, so kann das restliche im Urin ausgeschiedene m^7Gua dem Umsatz von mRNA (genauer demjenigen der "mRNA-Caps") zugeordnet werden. Damit wurde erstmals ein Konzept vorgestellt, das eine getrennte Berechnung der Ganzkörper-Umsätze von tRNA, rRNA und mRNA-Caps gestattet (Sander et al, 1986b; Schöch et al, 1988a).

Beim Vergleich der Ganzkörper-Umsätze von tRNA, rRNA und mRNA von Frühgeborenen und Erwachsenen zeigte sich, daß diese bei Frühgeborenen sämtlich etwa dreimal höher liegen als bei Erwachsenen (Sander et al, 1986b; Schöch et al, 1988a). Dieser bei Frühgeborenen etwa dreimal höhere RNA-Umsatz wird von einem dreimal höheren Muskelproteinumsatz (Sander et al, 1986c), einem etwa dreimal höheren Gesamtproteinumsatz und einem etwa zweieinhalbfachen Grundumsatz begleitet (Schöch et al, 1988a). Diese Zahlen lassen vermuten, daß ein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen dem Ganzkörper-Protein-Umsatz, der Intensität des Ganzkörper-RNA-Umsatzes sowie der Ganzkörper-Stoffwechselaktivität besteht (Schöch et al, 1988a,b).

Modifizierte RNA-Kataboliten können demnach nicht nur als Meßgrößen für den Ganzkörper-Umsatz der einzelnen RNA-Klassen verwendet werden, sondern könnten darüber hinaus als allgemeine Stoffwechselaktivitätsmarker dienen.

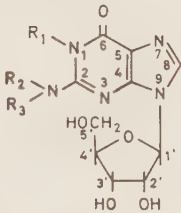
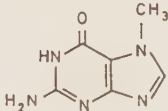
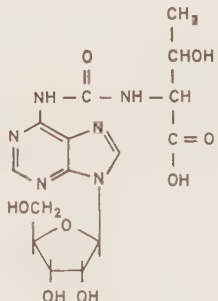
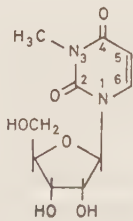
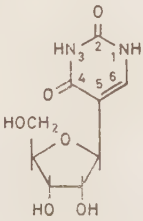
 m^1G: 1-Methylguanosin R_1: $-CH_3$; R_2, R_3: $-H$ m^2G: N^2-Methylguanosin R_1, R_2: $-H$; R_3: $-CH_3$ m_2^2G: N^2, N^2-Dimethylguanosin R_1: $-H$; R_2, R_3: $-CH_3$ Abspaltung der β-D-Ribose führt zu den entsprechenden modifizierten Nucleobasen: m^1Gua, m^2Gua, m_2^2Gua	 m^7Gua: 7-Methylguanin  t^6A: N^6-Threoninocarboxyladenosin
 m^3U: 3-Methyluridin	 Ψ: Pseudouridin

Abbildung 3:
Strukturformeln der untersuchten RNA-Kataboliten

1.4. Studienaufbau

Ziel der Untersuchungen war der tierexperimentelle Nachweis der quantitativen Ausscheidung von RNA-Kataboliten, die nach früheren Untersuchungen am Menschen bzw. aufgrund ihres Vorkommens in bestimmten RNA-Klassen als klassenspezifische RNA-Umsatzmarker in Frage kommen: m_2^2G (tRNA), t^4A (tRNA) und m^3U (rRNA). In diesem Rahmen wurden auch mögliche Umsetzungen modifizierter RNA-Kataboliten sowie Serumspiegel (beim Menschen) der für RNA-Umsatzbestimmungen wichtigsten Kataboliten untersucht.

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden an folgenden Säuger-Spezies durchgeführt (jeweils in Klammern die Begründung):

- Ratten (einfache Haltung in Stoffwechselkäfigen);
- Tupaia (verhältnismäßig einfache Haltung; 24 h-Urinsammlung möglich; als ursprüngliche, möglicherweise den Primaten nahestehend geltende Kleinsäuger);
- verschiedene Primaten (phylogenetische Nähe zum Menschen). Hier wurden nur Spontanurinproben untersucht.

Quantitative Ausscheidung von m_2^2G wurde von Sander et al (1986a,b) postuliert. Eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, dieses Postulat zu sichern. Der Nachweis der quantitativen Ausscheidung von m_2^2G war wichtig, weil dieses Nucleosid wegen seiner bekannten Spezifität für tRNA und wegen seines bekannten durchschnittlichen Vorkommens in tRNA bei gesicherter quantitativer Ausscheidung ein hervorragender tRNA-Umsatzmarker sein sollte: m_2^2G ist nicht nur kommerziell erhältlich, es ist auch zugleich eines der häufigeren Nucleoside in tRNA und wird dementsprechend in verhältnismäßig großen Mengen im Urin ausgeschieden. Mit dem Nachweis der quantitativen Ausscheidung sollte zugleich die Richtigkeit des obengenannten Verfahrens (S. 19 - 20) zur getrennten Berechnung der Ganzkörper-Umsätze von tRNA, rRNA und mRNA-Cap mit m_2^2G als "Archimedischem Punkt" bestätigt werden.

Darüber hinaus sollte nach einem möglichen spezifischen Marker für den rRNA-Umsatz gesucht werden. In Frage kam u.a. das kommerziell erhältliche m^3U (Tab. 4, S. 19). Damit sollte das bis dahin allein verwendete, auf Differenzbildung beruhende Verfahren zur rRNA-Umsatzbestimmung

($\Psi_{\text{tRNA}} = \Psi_{\text{gesamt}} - \Psi_{\text{tRNA}}$; S. 19 - 20) bestätigt und womöglich vereinfacht werden.

Für den Nachweis der Nichtverstoffwechselung und der quantitativen Ausscheidung von m_2^2G wurden folgende Versuche durchgeführt:

- Messung der Ausscheidung von t^4A , das tRNA-spezifisch ist (Tab. 4, S. 19) und nach Hong et al (1973) quantitativ ausgeschieden wird (alle genannten Spezies sowie Mensch);
- Vergleich der Meßwerte von m_2^2G und t^4A im Urin mit der bekannten durchschnittlichen Verteilung von m_2^2G und t^4A in cytoplasmatischer tRNA (0.501 : 0.224, vgl. Tab. 1, S. 5);
- i.p. Injektionsversuche mit anschließenden Urinalysen und Bestimmung der Wiederfindungsrate als Maß für quantitative oder nichtquantitative Ausscheidung (Tupaia);
- Inkubationsversuche mit Extrakten aus verschiedenen Organen zum Nachweis einer eventuellen Verstoffwechselung (Ratten, Tupaia).

Für den Nachweis der Nichtverstoffwechselung und der quantitativen Ausscheidung von m^3U wurden folgende Versuche durchgeführt:

- Vergleich mit dem nach Schöch et al (1988a) berechneten Ψ -Anteil aus rRNA im Urin (Ratten, Tupaia, Saguinus, Pavian) sowie mit der bekannten durchschnittlichen Verteilung von Ψ und m^3U in cytoplasmatischer rRNA (95 : 1, vgl. Tab. 2, S. 8);
- i.p. Injektionsversuche mit anschließenden Urinalysen (wie oben);
- Inkubationsversuche mit postribosomalem Überstand aus Leber (Tupaia).

Weiterhin sollte die von Sander et al (1986a,b) vermutete Verstoffwechselung der Nucleoside m^4G und m^2G , die beide in tRNA vorkommen (Tab. 4, S. 19), untersucht werden. Die hierfür durchgeführten Versuche entsprachen denjenigen zum Nachweis der quantitativen Ausscheidung von m_2^2G .

Eine zusätzliche Aufgabe bestand darin, Serumkonzentrationen der für die Berechnung des Umsatzes von tRNA, rRNA und mRNA verwendeten RNA-Kataboliten m_2^2G , Ψ und m^7Gua beim Menschen zu bestimmen. Diese Messungen sollten Auskunft darüber geben, ob die Serumspiegel dieser RNA-Kataboliten sich bei verschiedenen Individuen unterscheiden, und ob sich beim Menschen Aussagen über mögliche Ausscheidungsmechanismen machen lassen.

2. Experimenteller Teil

2.1. Analyse modifizierter Ribonucleoside und modifizierter Nucleobasen aus Urin

2.1.1. Probanden

Urine von Erwachsenen sowie Blut für die Untersuchung modifizierter RNA-Kataboliten in Serum und Plasma stammten von Mitarbeitern des Forschungsinstitutes für Kinderernährung in Dortmund. Urine von frühgeborenen Kindern wurden in der Universitäts-Kinderklinik B in Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. E. Schmidt) gesammelt.

2.1.2. Versuchstiere und Tierhaltung

Zur Sammlung von 24 h-Urinen von Ratten wurden 10 männliche 72 Tage alte Wistar-Ratten in Stoffwechsel-Käfigen (pro Käfig 1 Tier; Typ R/M, Altromin) gehalten. Die Räumlichkeiten wurden freundlicherweise vom Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund (Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt) zur Verfügung gestellt. Futter (Standard-Diät, Altromin) und Trinkwasser wurden ad libitum gegeben. Die Sammlung des Urins erfolgte in eisgekühlten Glasgefäßen. Die Raumtemperatur betrug durchschnittlich 21° C, die Luftfeuchtigkeit 50 - 60 %. Die Lichtphase begann um 6.00 Uhr und endete um 18.00 Uhr.

Urinsammlungen und Belastungsversuche mit modifizierten Ribonucleosiden bei Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*) wurden an vier erwachsenen männlichen Tieren durchgeführt (in Zusammenarbeit mit Dr. E. Fuchs am Deutschen Primatenzentrum Göttingen; Direktor: Prof. Dr. H.-J. Kuhn). Die Tiere stammten aus der Zuchtkolonie des Deutschen Primatenzentrums. Jedes Tier bewohnte einen Käfig von 50 x 80 x 124 cm (B x T x H). Die Käfige waren identisch mit horizontal und diagonal angeordneten Ästen eingerichtet. An der Außenseite des Käfigs war eine Schlafkiste aus Holz angebracht. Zwischen benachbarten Käfigen befanden sich Sichtblenden. Die Raumtemperatur betrug $27 \pm 1^\circ \text{C}$, die Luftfeuchtigkeit lag bei $60 \pm 7 \%$. Die Lichtphase begann um 8.00 Uhr und endete um 20.00 Uhr.

Futter (Tupaia-Standard-Diät, Altromin) und Wasser wurden ad libitum gegeben. Zum Sammeln des Urins wurden Plastikmatten mit regelmäßigen konkaven Vertiefungen dicht unter die Käfige geschoben sowie PVC-Stangen mit Rinnen und verdecktem Auffanggefäß in die Käfige gestellt. Außerdem wurde der Urin jeden Morgen nach manuellem Druck auf die Blase der Tiere direkt gesammelt.

Urine von Primaten stammten ebenfalls vom Deutschen Primatenzentrum.

2.1.3. Injektionsversuche mit modifizierten Ribonucleosiden bei Tupaia

Bei den Injektionsversuchen mit modifizierten Ribonucleosiden wurde der Urin zwei Tage vor der Injektion und zwei bis drei Tage nach der Injektion gesammelt. Die Injektionen erfolgten intraperitoneal abends um 20.00 Uhr. Die Injektionslösungen und der gesammelte Urin wurden in eingefrorenem Zustand in Trockeneis verpackt zwischen Dortmund und dem Deutschen Primatenzentrum Göttingen transportiert. Zum Ansetzen der Injektionslösungen wurde Wasser verwendet, welches über ein Milli-Q-System (Millipore-Waters) gereinigt war. Eine zusätzliche Sterilisation der Lösungen erfolgte nicht. Die eingefrorenen Lösungen wurden vor der Injektion 30 min bei 56° C aufgetaut. Unabhängige Injektionsversuche wurden mit folgenden Substanzen durchgeführt:

Pseudouridin

Die Injektionen erfolgten bei 4 Tieren mit jeweils 7215 nmol Pseudouridin in 500 µl 0.9 % NaCl-Lösung.

3-Methyluridin, N²,N²-Dimethylguanosin, 1-Methylguanosin und N²-Methylguanosin

Diese modifizierten Nucleoside wurden jeweils kombiniert in 500 µl Gesamtvolumen injiziert. Es wurden zwei Injektionsdurchgänge mit jeweils 4 Tieren durchgeführt. Im 500 µl- Injektionsgemisch des 1. Durchgangs waren in 0.85 % NaCl-Lösung folgende Mengen an modifizierten Nucleosiden enthalten:

47.4 µl 7.5 mM m_2^2G (in 0.2 M Ameisensäure),
47.4 µl 7.1 mM m^1G (in H_2O),
47.4 µl 5.9 mM m^2G (in 0.3 M Ameisensäure),
4.6 µl 13.2 mM m^3U (in H_2O),
26 µl 2.5 % Ammoniaklösung.

Ammoniaklösung wurde dem Gemisch beigelegt, um einen pH von ~7.5 zu erreichen. Zur Herstellung der Stammlösungen wurden m_2^2G und m^2G 30 bzw. 90 min bei 60° C im Ultraschallbad inkubiert.

Beim 2. Durchgang waren in jeweils 500 µl 0.87 % NaCl-Lösung die modifizierten Nucleoside in folgenden Mengen enthalten:

48.5 µl 7.5 mM m_2^2G (in 0.38 M Ameisensäure),
48.5 µl 7.7 mM m^1G (in H_2O),
48.5 µl 6.3 mM m^2G (in 0.83 M Ameisensäure),
4.7 µl 14.9 mM m^3U (in H_2O),
15 µl 10 % Ammoniaklösung.

Kontrolle

Als Kontrollversuch wurden 4 Tieren jeweils 500 µl 0.83 % NaCl-Lösung in 62.6 mM Ameisensäure und 0.18 % Ammoniaklösung injiziert.

2.1.4. Kombinierte Vorfraktionierung von Ribonucleosiden und Nucleobasen

Urin wurde zur getrennten Anreicherung von Nucleobasen bzw. Ribonucleosiden zunächst über ein Anionenaustauscher-Harz, anschließend in einem Arbeitsgang über ein Phenylborsäure-Gel vorfraktioniert (Schöch et al, 1980; Sander et al, 1985). Diese kombinierte Methode wurde zur Bestimmung sowohl von modifizierten Nucleobasen als auch von modifizierten Ribonucleosiden aus Human-Urin verwendet. Bei allen anderen untersuchten Urinen (Ratte, Tupaia, Primaten) diente die gleiche Methode zur Vorreinigung von modifizierten Nucleobasen; zur Bestimmung von modifizierten Ribonucleosiden wurden die Urinproben wie unter 2.1.5. beschrieben vorgereinigt. Abbildung 4 zeigt schematisch die einzelnen Schritte dieser kombinierten Methode.

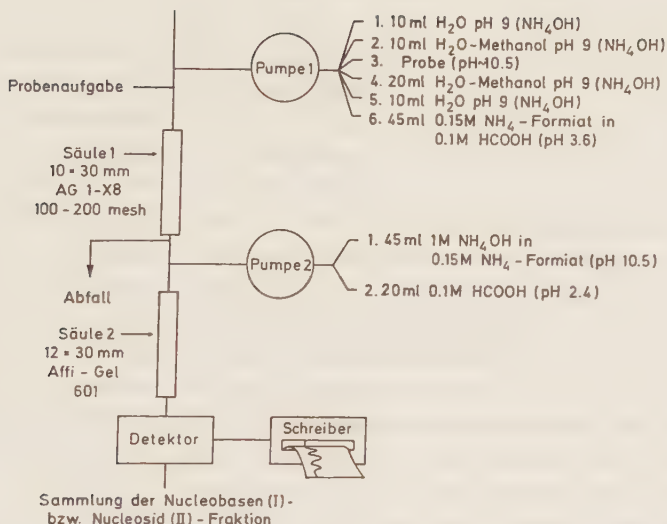


Abbildung 4:
Vorfraktionierung von Ribonucleosiden und Nucleobasen

Verwendet wurden Glassäulen (Schott). Eine konstante Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/min wurde mit einer peristaltischen ip-12 Pumpe (Isma-tec) eingestellt. Über einen 8-Wege-Hahn (Omnifit) konnten die jeweils benötigten Lösungen in den Flüssigkeitsstrom zur Säule 1 eingebracht werden. Am Ende der Säule 1 befand sich ein Dreiweghahn (Omnifit), über den das Permeat der Säule 1 entweder verworfen oder zur Säule 2 geleitet werden konnte. Ein weiterer Dreiweghahn zwischen Säulen 1 und 2 erlaubte die Zuführung von alkalischem Puffer zum sauren Eluat der Säule 1 bzw. die Elution der Nucleoside von Säule 2 bei pH 2.4 (s.u.). Die Nucleobasen bzw. Nucleoside enthaltenden Fraktionen wurden mit einem UV-Photometer (Knauer, Typ 7100) und angeschlossenen Schreiber (LM24, Linseis) registriert.

Die folgenden Urinmengen wurden zur Vorreinigung eingesetzt:

600 µl Human-Urin, 600 µl Ratten-Urin (1 : 4 mit H₂O verdünnt), 500 µl

Tupaia-Urin (1 : 5 mit H₂O verdünnt) und jeweils 500 µl Primaten-Urin (1 : 4 mit H₂O verdünnt). Der Urin wurde nach Zusatz von 20 µl Ammoniaklösung (25 %), 600 µl Methanol, 10 µl 4 mM Tubercidin (externer Standard für die Nucleoside) und 10 µl 10 mM 6-Methylisocytosin (externer Standard für die Nucleobasen) 10 min bei 10 000 x g in einer Eppendorf 5412-Zentrifuge zentrifugiert. 1 ml vom Überstand (bei Menschen-, Primaten- und Ratten-Urinen) bzw. der gesamte Überstand (bei Tupaia-Urin) wurde auf das Anionenaustauscher-Harz (AG 1-XB) der Säule 1 aufgegeben. Diese wurde zuvor mit H₂O pH 9 (eingestellt mit NH₄OH) und H₂O-Methanol (80 : 20) pH 9 (eingestellt mit NH₄OH) gewaschen. Während der nach Aufgabe der Probe durchgeführten Waschschr tte mit H₂O-Methanol (80 : 20) pH 9 und anschließend mit H₂O pH 9 (beide eingestellt mit NH₄OH) blieben die Nucleobasen und Nucleoside gebunden. Ihre Elution erfolgte mit 0.15 M Ammoniumformiat in 0.1 M Ameisensäure pH 3.6. Gleichzeitig wurde diesem Eluat von Säule 1 eine Lösung von 1 M NH₄OH in 0.15 M Ammoniumformiat (pH 10.5) zugemischt. Das sich ergebende alkalische Puffer-Gemisch wurde über die mit einem Phenylborsäure-Gel (Affi-Gel 601) gef llte Säule 2 gepumpt. Während die Nucleobasen nicht an das Affinitäts-Gel binden und aufgefangen wurden (Fraktion I), blieben die unmodifizierten sowie die an der Base modifizierten Ribonucleoside aufgrund der cis-diol-Gruppe der Ribose spezifisch gebunden. Ihre Elution erfolgte mit 0.1 M Ameisensäure pH 2.4 (Fraktion II).

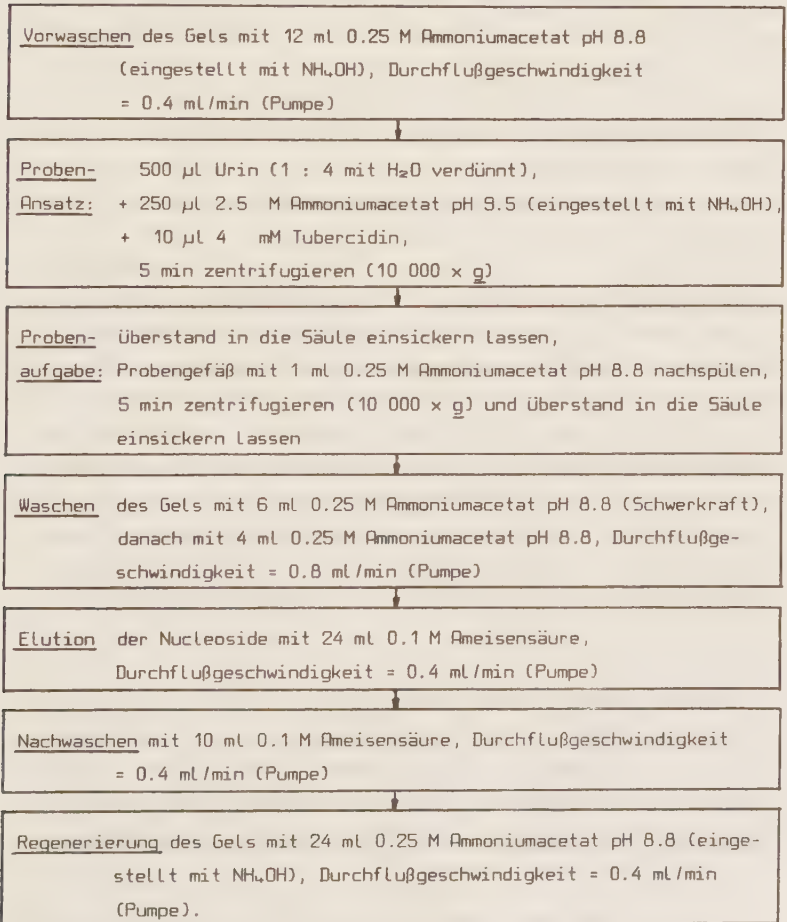
Fraktion I (Nucleobasen; ~50 ml) wurde bei 95° C in einem Thermochem-Metallblock-Thermostat (Liebisch) bis zur Trockne eingengt und zweimal nacheinander in 5 ml H₂O resuspendiert und jeweils bei 95° C eingengt. Der Rückstand wurde in 1 ml 200 mM Ammoniumphosphat, 10 % Methanol, pH 5.3 (eingestellt mit NH₄OH) aufgenommen und bei -20° C gelagert.

Fraktion II (Nucleoside; ~20 ml) wurde bei -20° C eingefroren und mit einer GT 2-Gefriertrocknungsanlage (Leybold-Heraeus) lyophilisiert. Anschließend wurde das Lyophilisat in 1 ml oder 1.5 ml 10 mM Ammoniumphosphat pH 5.1 (eingestellt mit NH₄OH) 5 min bei 50° C resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

Die Regenerierung des AG 1-XB Harzes erfolgte mit 60 ml 2 M NaOH und anschließender Waschung mit 120 ml H₂O, die des Affinitäts-Gels mit 60 ml 0.1 M NH₄OH in 0.25 M Ammoniumformiat pH 9.5 (eingestellt mit NH₄OH).

2.1.5. Selektive Vorfraktionierung von Ribonucleosiden

Ribonucleoside wurden aus den untersuchten Urinen (außer bei Human-Urin) ausschließlich über ein Phenylborsäure-Gel (Affi-Gel 601) angereichert (modifiziert nach Gehrke et al, 1978). Das folgende Schema gibt die einzelnen Schritte dieser Methode wieder.



Die Abmessungen der Säule waren identisch mit denen der Säule 2 in Abbildung 4 (2.1.4.). Die Förderung der Lösungen über die Säule erfolgte ebenfalls mit einer peristaltischen ip-12 Pumpe (Ismatec). Lediglich bei der Probenaufgabe und dem nachfolgenden Waschschrift mit 6 ml 0.25 M Ammoniumacetat pH 8.8 erfolgte das Einsickern der Lösungen mittels Schwerkraft. Das Säulenpermeat wurde durch UV-Photometer (Bischoff Typ LCD 101 bzw. Knauer Typ 7100) geleitet, die mit einem Schreiber Typ LS 4 (Linseis) verbunden waren. Die nucleosidhaltige Fraktion (12 - 15 ml) wurde wie bei der unter 2.1.4. beschriebenen Methode weiterbehandelt.

2.1.6. HPLC-Verfahren zur Messung von Ribonucleosiden und Nucleobasen

Zur Messung der Ribonucleoside bzw. Nucleobasen wurden insgesamt drei verschiedene HPLC-Verfahren verwendet. Bei allen drei Verfahren erfolgte die Detektion der Substanzen bei 254 nm und 280 nm (Detektoren: Typ 160, Beckman und Uvikon 740 LC, Kontron). Nucleoside und Nucleobasen wurden aufgrund ihres spezifischen Elutionsvolumens, gemessen als Retentionszeit bei konstanter Durchflußgeschwindigkeit, und des spezifischen Quotienten A_{254nm}/A_{280nm} identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte über eine Integration der Peak-Flächen bzw. über eine Auswertung der Peak-Höhen mit SP 4270-Integratoren (Spectra-Physics). Die Reinheit der Standardsubstanzen wurde mit einem Zeiss PM-4 Photometer spektroskopisch überprüft, indem die Meßergebnisse mit den Angaben im Handbook of Biochemistry and Molecular Biology 3rd Edition, Fasman GD (ed), Nucleic Acids, Volume I (CRC Press, Cleveland 1975), verglichen wurden.

Ribonucleoside

Zur Trennung der Ribonucleoside wurde eine reversed-phase-Chromatographie verwendet (Gehrke et al, 1978; Schöch et al, 1980; Sander et al, 1985). Eine Stahlsäule (4.6 x 250 mm, Bischoff) enthielt als stationäre Phase ein Nucleosil 120-5 C₁₈-Gel. Die Packung des Gels erfolgte mit Methanol bei 560 bar mit einer HPLC-Säulenfüllapparatur (Shandon; 3.2 g Gel in Isopropanol suspendiert).

Ribonucleoside wurden isokratisch entweder mit 10 mM Ammoniumphosphat pH 5.1 (eingestellt mit NH₄OH) oder mit 10 mM Ammoniumphosphat, 4.5 %

Methanol, pH 5.1 (eingestellt mit NH_4OH) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/min eluiert. Die Säule wurde mit einem WK3 Kryothermostaten (Colora) bei 36° C thermostatisiert. Als HPLC-Pumpe wurde eine Beckman 112-Pumpe eingesetzt. Wasser für die Elutionspuffer wurde mit einem Milli-Q-System (Millipore-Waters) gereinigt, das mit einem 0.45 μm Membranfilter sowie zusätzlich einer Organex-Kartusche ausgestattet war. Die Entgasung des Wassers für diese HPLC-Methode erfolgte über 3 Stunden unter reduziertem Druck (Wasserstrahlpumpe). Nach dem Auftauen (15 min bei 56° C) der nucleosidhaltigen Fraktion des vorfraktionierten Urins (s. 2.1.4. und 2.1.5.) und anschließender Zentrifugation (10 min bei 10 000 $\times g$) erfolgte die Probenaufgabe (100 - 200 μl -Aliquot) entweder manuell mit einem Probenaufgabeventil Modell 7125 (Rheodyne) oder mit einem automatischen Probenaufgeber Typ WISP 710 B (Millipore-Waters).

Pseudouridin

Pseudouridin läßt sich beim obigen Verfahren kaum quantifizieren. Daher wurde eine besondere HPLC-Methode zur direkten Bestimmung von Pseudouridin in verdünntem Nativ-Urin entwickelt (Topp et al, 1985). Bei dieser Methode kann Harnsäure gleichzeitig mitbestimmt werden. Bei -20° C gelagerter Urin wurde 15 min bei 56° C aufgetaut und 10 min bei 10 000 $\times g$ zentrifugiert. Ein 10 - 40 μl -Aliquot des zuvor mit 10 mM Ammoniumphosphat pH 9 (mit NH_4OH eingestellt) 1 : 20 verdünnten Überstandes wurde direkt über ein Kationenaustauscher-Harz DC-6A (Dionex) chromatographiert. Dazu wurde das Harz auf exakt 310 mm Betthöhe in eine Glassäule mit 6 mm Innendurchmesser (Biotronik) gefüllt. Die Säule wurde mit einem Haake FE Wasserbad bei 40° C thermostatisiert. Die Elution erfolgte isokratisch mit 10 mM Ammoniumphosphat (mit 1 M Phosphorsäure auf pH 3.5 eingestellt) bei konstanter Durchflußgeschwindigkeit von 0.18 ml/min (umgebaute "Minipump", Milton Roy). Zwecks Entgasung durchströmte der Elutionspuffer eine der Pumpe vorgeschaltete schräg stehende Heizmantelsäule (40° C). Die Proben wurden mit einem automatischen Probenaufgeber WISP 710 B (Millipore-Waters) auf die Säule injiziert.

Nucleobasen

Die Methode zur Analyse von Nucleobasen über ein Kationenaustauscher-Harz (Schöch & Heller-Schöch, 1977) wurde unter Verwendung des Harzes

DC-6A (Dionex) weiterentwickelt (Sander et al, 1985). Eine Glassäule mit 6 mm Innendurchmesser (Biotronik) wurde auf exakt 210 mm Betthöhe mit DC-6A-Harz gefüllt. Die Thermostatisierung der Säule auf 40° C erfolgte mit einem Haake D 8-L Wasserbad. Der Elutionspuffer (200 mM Ammoniumphosphat, 10 % Methanol, pH 5.3, eingestellt mit NH₄OH) wurde nach Entgasung bei 40° C in einer Heizmantelsäule mittels einer Milton Roy "Minipump" mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 0.3 ml/min gefördert. Nach dem Auftauen (15 min bei 95° C) der nucleobasenhaltigen Fraktion des vorfraktionierten Urins (s. 2.1.4.) und anschließender Zentrifugation (10 min bei 10 000 x g) erfolgte die Probenaufgabe eines 20 - 80 µl-Aliquots mit einem automatischen Probenaufgeber Typ WISP 710 B (Millipore-Waters).

2.1.7. Bestimmung von Kreatinin

Kreatinin wurde in verdünntem Urin direkt mit einem Beckman Creatinine Analyser 2 bestimmt.

2.2. Analyse von Pseudouridin, 7-Methylguanin, N²,N²-Dimethylguanosin und Kreatinin aus Serum und Plasma

2.2.1. Enteiweißung von Serum und Plasma

Ultrafiltration

Es wurde eine Methode entwickelt (Topp et al, 1985 und 1987), bei der die Enteiweißung von Serum bzw. Plasma über eine Ultrafiltration durch Mikrokollodiumhülsen Typ SM 132 02 (Sartorius; Membranfilter aus Zellulosenitrat mit einer nominellen Molekulargewichts-Trenngrenze von 12 400) erfolgte. Dabei wurde Serum bzw. Plasma mit Stickstoff (10 bar) durch die Mikrokollodiumhülsen gepreßt, die sich in Makrolonstützkörpern (Typ SM 165 36 E, Sartorius) befanden. Die Stützkörper selbst waren in eine Druckfiltrationsleiste (Typ SM 165 38, Sartorius) eingespannt. Bei diesem Verfahren sammelt sich das Filtrat im unteren Teil des Makrolonstützkörpers, so daß keine Rückdiffusion von Substanzen in die zu filtrierende Lösung stattfinden kann. Zur Gewinnung von Serum wurde Blut in Probenröhrchen Typ SE 40 (Kabe) 1 h bei Raumtemperatur stehengelassen und danach 4 min bei 10 000 x g (Eppendorf 5412 Zentrifuge) zentrifugiert. Die Gewinnung von Plasma erfolgte, indem Blut direkt nach der Abnahme in Ammonium-Heparinat-präparierten Probenröhrchen Typ AH/40 (Kabe) 4 min bei 10 000 x g zentrifugiert wurde.

Für die Bestimmung von γ wurden 0.4 ml Serum bzw. Plasma über eine Mikrokollodiumhülle bei Raumtemperatur filtriert. Danach wurden 2 mal 0.4 ml H_2O durch die Hülle gepreßt. Das kombinierte Filtrat wurde entweder bei $-20^\circ C$ gelagert, oder es wurde ein Aliquot direkt zur HPLC-Messung verwendet.

Zur Bestimmung von Kreatinin wurden 0.8 ml Serum bzw. Plasma, gefolgt von 2 mal 0.8 ml H_2O , durch eine Mikrokollodiumhülle gepreßt. Ein Aliquot des kombinierten Filtrats wurde mittels HPLC analysiert.

Wegen der geringen Konzentration von m^7Gua und m^2G in Serum und Plasma wurden zu deren Bestimmung jeweils 2.4 ml Serum bzw. Plasma durch drei Mikrokollodiumhüllen filtriert, gefolgt von 2 mal 2.4 ml H_2O . Die kombinierten Filtrate wurden bei $-20^\circ C$ eingefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 500 μl H_2O resuspendiert und bis zur HPLC-Analyse bei $-20^\circ C$ gelagert.

Enteiiweißung mit Aceton

Zur Untersuchung der Umwandlung von m^7G zu m^7Gua in Serum wurde außer mit der oben beschriebenen Methode auch mit Aceton enteiiweißt. Nach Zugabe von 5.4 ml Aceton ($-20^\circ C$) zu 2.4 ml Serum wurde der Ansatz 20 h bei $-20^\circ C$ stehengelassen. Ausgefällte Proteine wurden 10 min bei $10\,000 \times g$ sedimentiert (Sorvall RC 2-B, $-20^\circ C$). Das Abdampfen des Acetons aus dem klaren Überstand erfolgte bei $40^\circ C$ im Stickstoff-Strom. Die Proben wurden bei $-20^\circ C$ eingefroren, lyophilisiert und in 500 μl H_2O resuspendiert. Ein 200 μl -Aliquot wurde mittels HPLC analysiert.

2.2.2. Vorfraktionierung von Ribonucleosiden mittels Affinitätschromatographie

Zur Absicherung des Befundes, daß kein m^7G in ultrafiltriertem Serum nachweisbar war (Topp et al, 1987), wurde Serum ohne vorherige Enteiiweißung in Anlehnung an Davis et al (1977) affinitätschromatographisch über ein Phenylborsäure-Gel (Affi-Gel 601) vorgereinigt. Bezüglich Säulenabmessungen und einzelner Elutionsschritte s. 2.1.5. Die Permeation der Lösungen durch die Säule erfolgte bei allen Schritten unter Schwer-

kraft. 1 ml Serum wurde durch Zusatz von 150 μ l 2.5 M Ammoniumacetat pH 8.8 (eingestellt mit NH_4OH) alkalisch gemacht und auf die Säule aufgetragen. Nach Elution der die Nucleoside enthaltenden Fraktion wurde diese bei -20°C eingefroren, lyophilisiert und in 500 μ l H_2O 2 min bei 60°C resuspendiert. Anschließend wurde sie nochmals eingefroren, lyophilisiert und in 220 μ l H_2O 10 min bei 37°C resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 200 μ l zur HPLC-Analyse verwendet.

2.2.3. HPLC-Verfahren

Die Quantifizierung von Pseudouridin, m^7Gua , m^2G und Kreatinin aus Serum bzw. Plasma erfolgte ohne weitere Aufarbeitung der Filtrate bis auf eine zusätzliche Konzentrierung bei Bestimmung von m^7Gua und m^2G (s. 2.2.1.; Topp et al, 1985 und 1987). Es wurden HPLC-Methoden verwendet, die im Prinzip unter 2.1.6. erläutert sind. Tabelle 5 faßt die jeweiligen Chromatographie-Bedingungen für die Analyse der einzelnen Verbindungen aus Serum bzw. Plasma zusammen. Die Bedingungen für die Chromatographie von m^7G , das im Serum nicht gefunden wurde (Topp et al, 1987), sind ebenfalls in Tabelle 5 enthalten.

2.3. Versuche zur Verstoffwechselung modifizierter Ribonucleoside und modifizierter Nucleobasen in Gewebeextrakten

2.3.1. Herstellung von Rohhomogenaten und postribosomalen Überständen

Rohhomogenate

Organe von ausgewachsenen männlichen Fischer-Ratten (F344) bzw. Wistar-Ratten wurden sofort nach der Entnahme eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert. 1.3 g (F344) bzw. 3.2 g (Wistar) Leber wurden in gefrorenem Zustand in Stücke geschnitten, mit 5 ml eiskaltem Homogenisierpuffer (s. u.) versetzt und unter Eiskühlung mit einem Rührwerk Typ RZR 1 (Heidolph) in einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Der Homogenisierpuffer bestand aus 250 mM Saccharose, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 und 6 mM Mercaptoethanol (Schöch & Heller-Schöch, 1977).

Tabelle 5:

Chromatographie-Bedingungen zur Bestimmung von Ψ , $m^7\text{Gua}$, $m^7\text{G}$, $m^2_2\text{G}$ und Kreatinin aus ultrafiltriertem Serum bzw. Plasma

Sub- stanz	Säulenfü- lung und Abmessung	Elutionspuffer	Durchfluß- geschwin- digkeit	Säulen- Tempe- ratur	Aufgabemenge der enteweiß- ten Probe
Ψ	Dionex DC-6A 6x310 mm	10 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ mit 1 M H_3PO_4 auf pH 3.5 einge- stellt	0.18 ml/min	40° C	100 μl
$m^2_2\text{G}$	Nucleosil 120-5 C ₁₈ 4.6x250 mm	10 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ in 4.5 % Methanol mit NH_4OH auf pH 5.1 einge- stellt	1.0 ml/min	35° C	200 μl
$m^7\text{G}$	Nucleosil 120-5 C ₁₈ 4.6x250 mm	0.5 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ in 0.45 % Methanol mit H_3PO_4 auf pH 5.1 einge- stellt	2.0 ml/min	35° C	200 μl
$m^7\text{Gua}$	Dionex DC-6A 6x210 mm	200 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ in 10 % Methanol mit NH_4OH auf pH 5.3 einge- stellt	0.7 ml/min	40° C	200 μl
Krea- tinin	Dionex DC-6A 6x210mm	200 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ in 10 % Methanol mit NH_4OH auf pH 5.3 einge- stellt	0.7 ml/min	40° C	100 μl

Zur Herstellung von Nieren- bzw. Milz-Rohhomogenat wurden 2.6 (0.3) g Gewebe von Wistar-Ratten in gefrorenem Zustand zerschnitten und in 5 (2) ml Homogenisierpuffer homogenisiert.

Postribosomale Überstände

Tupaia-Lebern wurden nach Entnahme sofort eingefroren, der Versand vom Deutschen Primatenzentrum in Göttingen nach Dortmund erfolgte in Trockeneis. Zur Gewinnung postribosomaler Überstände aus Ratten- und Tupaia-Leber wurden jeweils 1.5 g Gewebe mit 5 ml eiskaltem Homogenisierpuffer (wie unter "Rohhomogenate" beschrieben) homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation des Homogenats bei $3\,000 \times g$ und 0°C (20 min; Sorvall RC-2B). Der Überstand wurde mit Homogenisierpuffer auf 6.4 ml aufgefüllt und 80 min (Tupaia-Leber 120 min) bei $200\,000 \times g$ und 0°C in einer Beckman L5-50 Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen (außer der obersten weißen Schicht, die vermutlich Lipide enthielt), durchmischt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.2. Inkubation von N^2, N^2 -Dimethylguanosin mit Rohhomogenaten

Zu jeweils 1 ml Rohhomogenat der verschiedenen Gewebe (bzw. 450 μl Milzhomogenat) wurden folgende Mengen m_2^2G (in 0.1 M Ameisensäure gelöst) hinzugegeben: 30 μl 3.47 mM m_2^2G (Leber, F344); 30 μl 3.53 mM m_2^2G (Leber, Wistar); 30 μl 1.21 mM m_2^2G (Niere, Wistar); 30 μl 1.21 mM m_2^2G (Milz, Wistar). Proteine wurden sofort bzw. nach 50 min Inkubation bei 37°C in einem Wasserbad (Heidolph) durch Zugabe von 1 ml (bzw. 450 μl beim Milzhomogenat) eiskalter 20 % Trichloressigsäure denaturiert. Der Ansatz wurde 30 min in Eis stengelassen und anschließend 30 min bei $3\,000 \times g$ zentrifugiert (Sorvall RC-2B). Der Überstand wurde mit H_2O auf 6.4 ml aufgefüllt und 2 Stunden bei $200\,000 \times g$ (Beckman L5-50) zentrifugiert. Danach wurden 1 ml-Portionen des Überstandes durch Zugabe von 40 μl 25 % Ammoniaklösung alkalisch gemacht ($\text{pH} \sim 9$) und bis zur Vorreinigung von m_2^2G über ein Phenylborsäure-Gel (Affi-Gel 601) bei -20°C gelagert.

2.3.3. Inkubation von modifizierten Ribonucleosiden und modifizierten Nucleobasen mit postribosomalen Überständen

Die eingefrorenen postribosomalen Überstände der Leberextrakte wurden 15 min bei 37° C aufgetaut. Zu 100 µl Überstand (80 µl Überstand bei Inkubation von m²G und m²Gua mit Rattenleberextrakt) wurden jeweils folgende Mengen authentischer Verbindungen (in 0.05 M Ameisensäure gelöst) hinzugegeben: 10 µl 1.74 mM m₂G; 10 µl 1.97 mM m¹G; 10 µl 1.77 mM m²G; 10 µl 1.95 mM m³U; 10 µl 2.37 mM G; 10 µl 1.54 mM m¹Gua; 10 µl 1.01 mM m²Gua und 10 µl 2.5 mM m₂Gua. Proteine wurden sofort bzw. nach verschiedenen langer Inkubation bei 37° C durch Zugabe von 100 µl eiskalter 20 % Trichloressigsäure (80 µl bei Inkubation von m²G und m²Gua mit Rattenleberextrakt) denaturiert. Nach einstündigem Stehen bei 4° C wurden die ausgefällten Proteine durch Zentrifugation (10 min bei 10 000 x g, Eppendorf 5412-Zentrifuge) sedimentiert. Der Überstand wurde nach Zusatz von 25 µl 25 % Ammoniaklösung in 2 gleiche Volumina aufgeteilt (80 - 100 µl) und bis zur weiteren Vorreinigung der Nucleoside bzw. Nucleobasen bei -20° C gelagert.

2.3.4. Vorfraktionierung der Ribonucleoside sowie der Nucleobasen und Quantifizierung mittels HPLC

N²,N²-Dimethylguanosin aus den Inkubations-Ansätzen mit Rohhomogenaten verschiedener Gewebe (2.3.2.) wurde über ein Phenylborsäure-Gel (Affi-Gel 601) gereinigt. Dazu wurden die bei -20° C gelagerten Proben (jeweils 1040 µl) 15 min bei 56° C aufgetaut und nach Zugabe von 10 µl 4 mM Tubercidin und 200 µl 2.5 M Ammoniumacetat pH 9.5 (eingestellt mit NH₄OH) auf das Gel aufgegeben.

Ribonucleoside aus den Inkubations-Ansätzen mit postribosomalen Überständen (2.3.3.) wurden ebenfalls über ein Phenylborsäure-Gel gereinigt. Die bei -20° C gelagerten Proben (80 - 100 µl) wurden 15 min bei 56° C aufgetaut und nach Zusatz von 800 µl H₂O und 10 µl 4 mM Tubercidin auf das Gel aufgegeben. Elutionsschritte und Abmessungen der Säulen s. 2.1.5.

Die Nucleosid-haltige Fraktion wurde lyophilisiert, das Lyophilisat wurde in 1 ml 10 mM Ammoniumphosphat pH 5.1 resuspendiert, ein 100 µl-Aliquot wurde auf Nucleosil 120-5 C₁₈ mit 10 mM Ammoniumphosphat, 4.5 % Methanol, pH 5.1, chromatographiert (2.1.6.).

Modifizierte Nucleobasen aus den Inkubations-Ansätzen mit postribosomalen Überständen (2.3.3.) wurden über ein Kationenaustauscher-Harz (AG 1-X8) und anschließende Passage über ein Phenylborsäure-Gel (Affi-Gel 601) wie unter 2.1.4. für die Vorfraktionierung von Nucleobasen aus Urin beschrieben gereinigt. Dazu wurden die bei -20° C gelagerten Proben (80 - 100 µl) 15 min bei 56° C aufgetaut und nach Zugabe von 400 µl H₂O, 600 µl Methanol, 20 µl Ammoniaklösung (25 %) und 10 µl 10 mM m⁺Isocyt auf das Anionenaustauscher-Harz aufgegeben. Die Nucleobasen-haltige Fraktion wurde wie unter 2.1.4. beschrieben eingengt und resuspendiert. Ein 20 µl-Aliquot wurde wie unter 2.1.6. beschrieben auf einem Dionex DC-6A-Harz chromatographiert.

3. Ergebnisse und Einzelkommentare

3.1. Ausscheidung modifizierter Ribonucleoside und modifizierter Nucleobasen im Urin

3.1.1. Bestimmung modifizierter Ribonucleoside aus Urin

Die vier modifizierten Nucleoside m^1G , m^2G , m_2^2G und t^4A konnten aus allen Urinproben der untersuchten Säuger mittels HPLC identifiziert und quantifiziert werden (Abb. 5 - 13). Die Nucleosid-haltigen Urin-Fractionen von Tupaia und Primaten wurden teilweise wegen der nicht ganz sauberen Trennung von m^1G bzw. m^2G bei der Elution mit 10 mM Ammoniumphosphat, 4.5 % Methanol, pH 5.1 (notwendig zur Bestimmung von t^4A) zusätzlich unter Verwendung von 10 mM Ammoniumphosphat pH 5.1 ohne Methanol chromatographiert, hier am Beispiel der Nucleosid-Fraktion aus Tupaia-Urin gezeigt (Abb. 9 und 10). Aus den Urinen von Ratte, Tupaia, Pavian und Saguinus gelang es, m^3U , das bisher nur als Bestandteil des Human-Urins beschrieben wurde (Gehrke & Kuo, 1985), zu identifizieren und zu quantifizieren (Abb. 5, 8, 9, 11 und 12 A).

Die Wiederfindungsraten von m^1G , m^2G und m_2^2G liegen im Human-Urin, nach deren kombinierter Vorreinigung über das Anionenaustauscher-Harz AG 1X8 und das Phenylborsäure-Gel (Affi-Gel 601) (s. 2.1.4.), bei annähernd 100 % (Sander et al, 1985).

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten von t^4A im Human-Urin nach gleicher Vorreinigung wurde t^4A jeweils 5 verschiedenen Erwachsenen-Urinen und 5 verschiedenen Frühgeborenen-Urinen zugesetzt (Tab. 6, S. 49).

Die in Tabelle 6 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Wiederfindung von t^4A nach dieser Vorreinigungsmethode niedriger liegt als diejenige von m_2^2G . Da die Wiederfindung von t^4A aber relativ gut reproduzierbar war, wurde diese Methode zur Bestimmung der t^4A -Konzentration in Human-Urin verwendet.

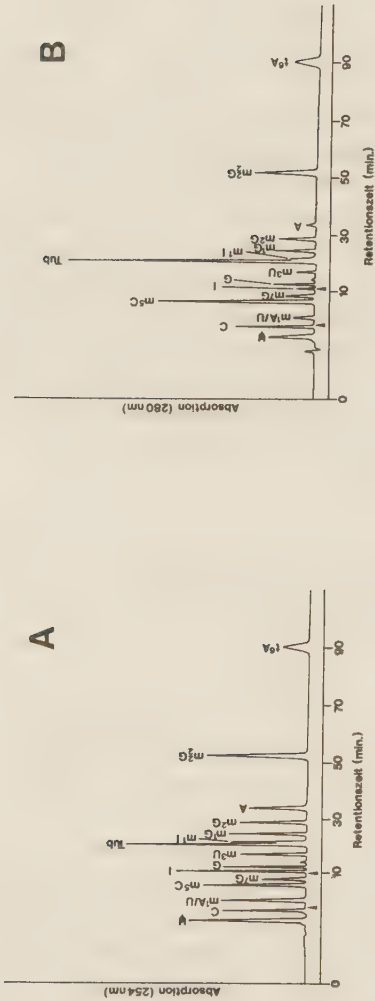


Abbildung 5:

HPLC-Trennung von Nucleosid-Standards auf Nucleosil 120-5 C₁₈ mit 10 mM Ammoniumphosphat, 4.5 % Methanol, pH 5.1. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung (A 254 nm, B 280 nm) 128-fach abgeschwächt. Folgende Mengen (pmol) wurden injiziert: γ 111.7; C 86.7; m¹A 56.7; U 35.5; m²C 191.7; I 135; G 79.2; m²U 130; Tub 620.8; m¹I 142.5; m¹G 130.8; m²G 118.3; A 137.5; m²G 294.2; t⁹A 174. Papiervorschub bis zum 1. Pfeil 0.5 cm/min, bis zum 2. Pfeil 0.25 cm/min, danach 0.1 cm/min.

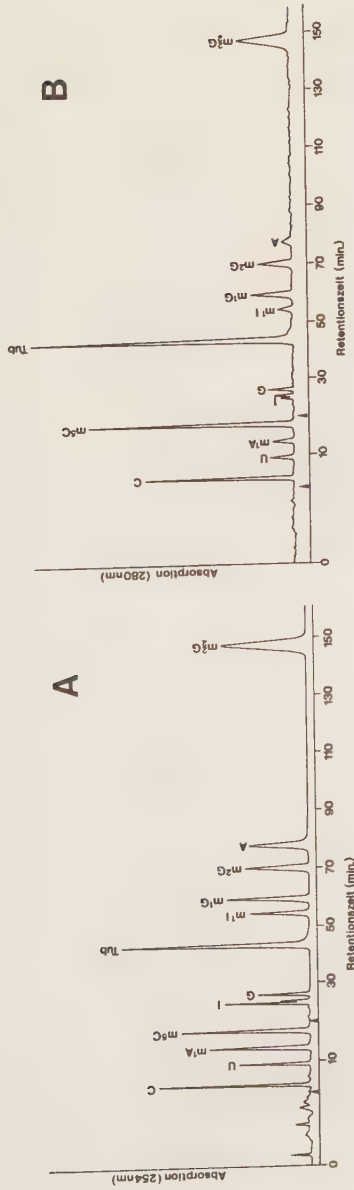


Abbildung 6:

HPLC-Trennung von Nucleosid-Standards auf Nucleosil 120-5 C₁₈ mit 10 mM Ammoniumphosphat pH 5.1. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung (A 254 nm, B 280 nm) 64-fach abgeschwächt. Folgende Mengen (pmol) wurden injiziert: C 130; U 53.3; m'A 85; m'G 101.3; G 59.5; Tub 916.8; m'I 171; m'A 196.3; m'G 177.5; A 206.3; m'G 434. Papiervorschub bis zum 1. Pfeil 0.5 cm/min, bis zum 2. Pfeil 0.25 cm/min, danach 0.1 cm/min.

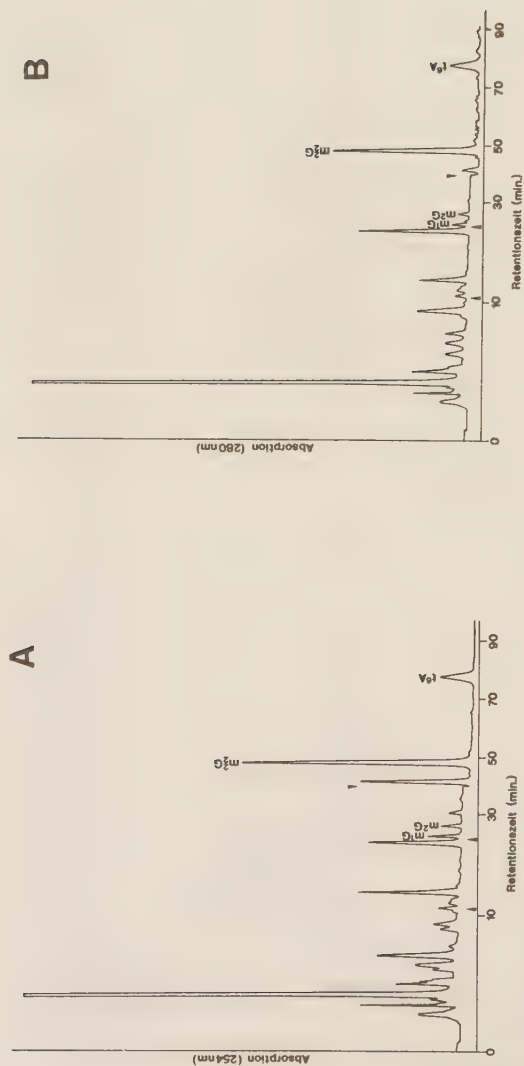


Abbildung 7:

HPLC-Trennung eines 150 µl-Aliquots der 'Nucleosid-Fraktion' aus Human-Urin (entsprechend ~48 µl Urin) auf Nucleosid 120-5 C₁₈ mit 10 mM Ammoniumphosphat, 4,5 % Methanol, pH 5.1. Die Vorreinigung des Urins erfolgte wie unter 2.1.4. beschrieben. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung (A 254 nm, B 280 nm) bis zum oberen Pfeil 512-fach, danach 64-fach abgeschwächt. Papiervorschub bis zum 1. unteren Pfeil 0.5 cm/min, bis zum 2. unteren Pfeil 0.25 cm/min, danach 0.1 cm/min.

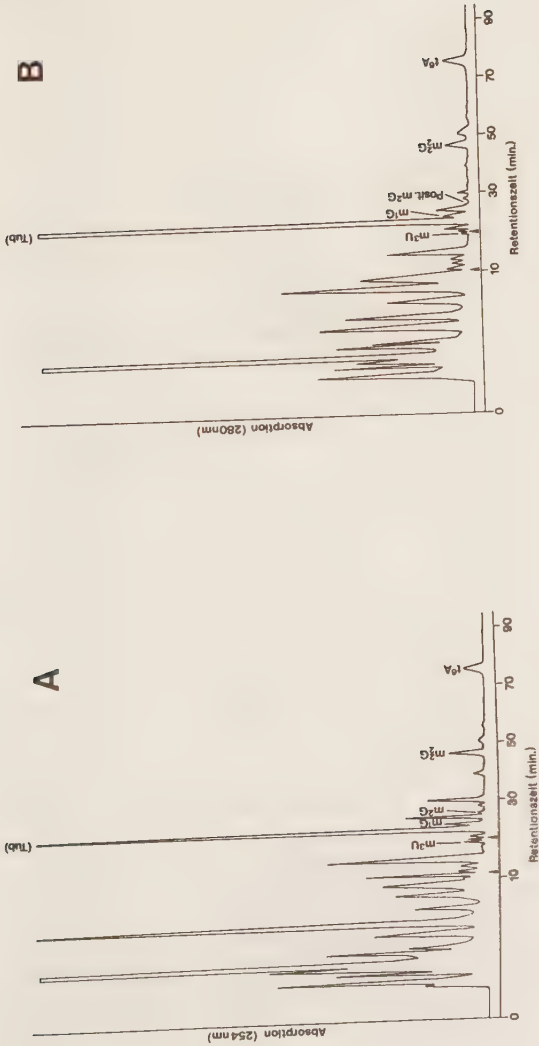


Abbildung 8:
HPLC-Trennung eines 100 µl-Aliquots der 'Nucleosid-Fraktion' aus Ratten-Urin (entsprechend ~12.5 µl Urin) auf Nu-
cleosid 120-5 C₁₈ mit 10 mM Ammoniumphosphat, 4.5 % Methanol, pH 5.1. Die Vorreinigung des Urins erfolgte wie
unter 2.1.5. beschrieben. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale
wurden zur Aufzeichnung (A 254 nm, B 280 nm) 128-fach abgeschwächt. Papiervorschub bis zum 1. Pfeil 0.5 cm/min,
bis zum 2. Pfeil 0.25 cm/min, danach 0.1 cm/min.

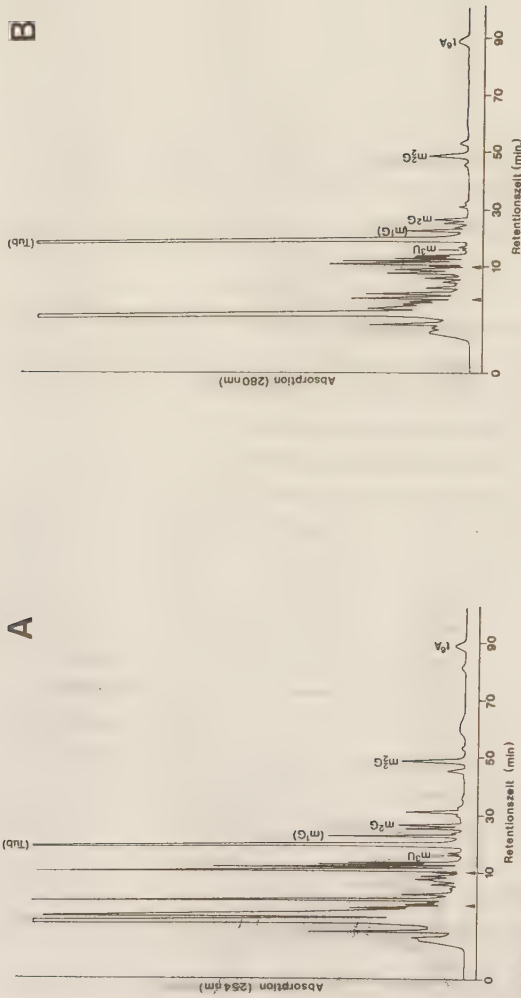


Abbildung 9: HPLC-Trennung eines 150 µl-Aliquots der "Nucleosid-Fraktion" aus Tupaia-Urin (entsprechend ~19 µl Urin) auf Nucleosid 120-5 C₁₈ mit 10 mM Ammoniumphosphat, 4,5 % Methanol, pH 5,1. Die Vorreinigung des Urins erfolgte wie unter 2.1.5. beschrieben. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung (A 254 nm, B 280 nm) 128-fach abgeschwächt. Papiervorschub bis zum 1. Pfeil 0.5 cm/min, bis zum 2. Pfeil 0.25 cm/min, danach 0.1 cm/min.

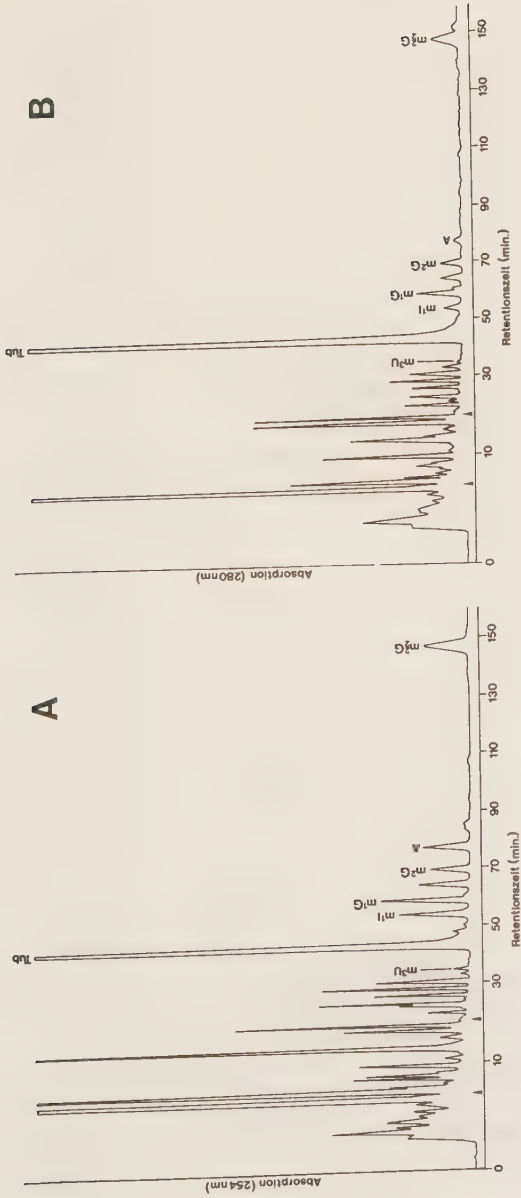


Abbildung 10:

HPLC-Trennung eines 150 μ l-Aliquots der "Nucleosid-Fraktion" aus Tupaia-Urin (entsprechend $\sim 19 \mu$ l Urin) auf Nucleosil 120-S C_{18} mit 10 mM Ammoniumphosphat pH 5.1. Die Vorreinigung des Urins erfolgte wie unter 2.1.5. beschrieben. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung (A 254 nm, B 280 nm) 64-fach abgeschwächt. Papiervorschub bis zum 1. Pfeil 0.5 cm/min, bis zum 2. Pfeil 0.25 cm/min, danach 0.1 cm/min.

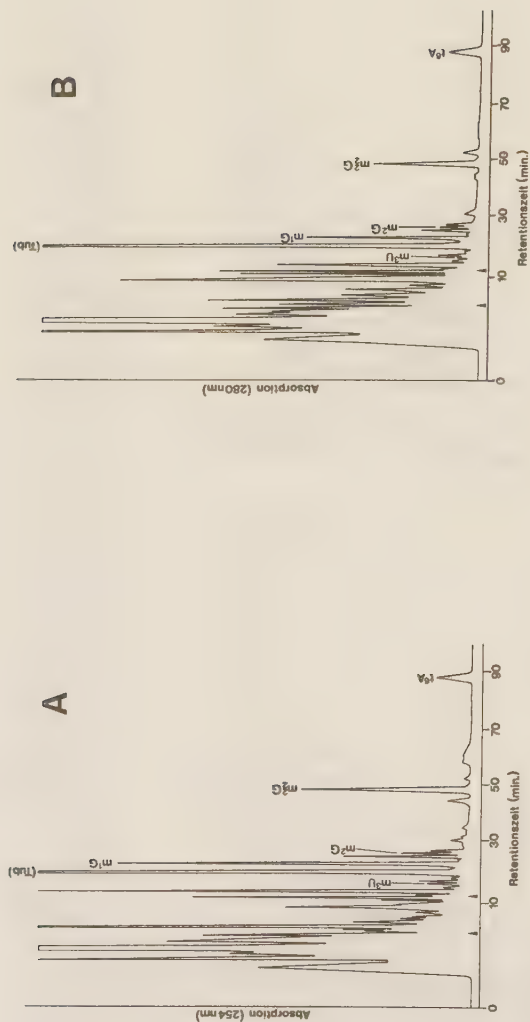


Abbildung 11:

HPLC-Trennung eines 150 μ l-Aliquots der 'Nucleosid-Fraktion' aus Pavian-Urin (entsprechend $\sim 19 \mu$ l Urin) auf Nucleosil 120-5 C₁₈ mit 10 mM Ammoniumphosphat, 4.5 % Methanol, pH 5.1. Die Vorreinigung des Urins erfolgte wie unter 2.1.5. beschrieben. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung (A 254 nm, B 280 nm) 128-fach abgeschwächt. Papiervorschub bis zum 1. Pfeil 0.5 cm/min, bis zum 2. Pfeil 0.25 cm/min, danach 0.1 cm/min.

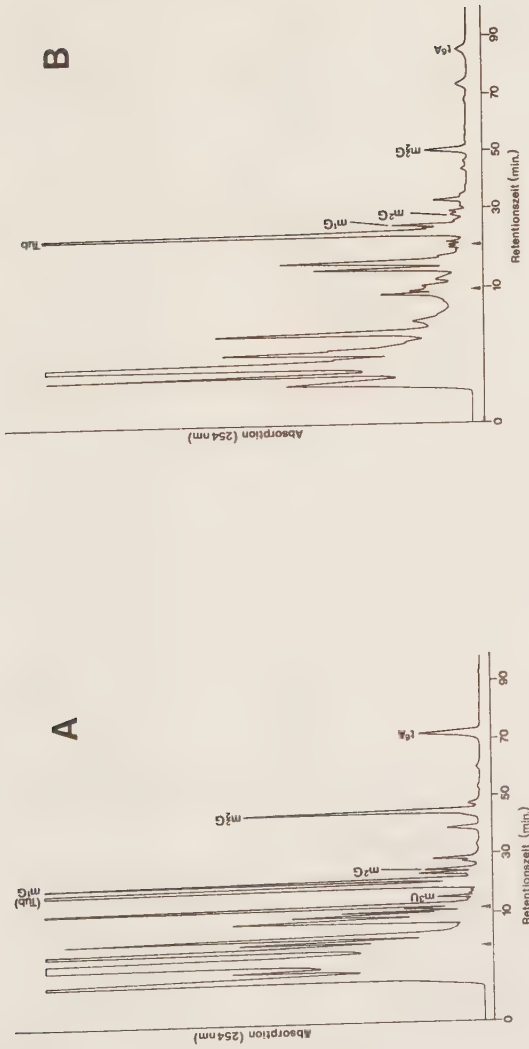


Abbildung 12:

HPLC-Trennung eines 100 μ l-Aliquots der 'Nucleosid-Fraktion' aus Saguinus-Urin (A) (entsprechend $\sim 12.5 \mu$ l Urin) bzw. eines 200 μ l-Aliquots der 'Nucleosid-Fraktion' aus Javaner-Urin (B) (entsprechend $\sim 25 \mu$ l Urin) auf Nucleosil 120-5 C₁₈ mit 10 mM Ammoniumphosphat, 4.5 % Methanol, pH 5.1. Die Vorreinigung des Urins erfolgte wie unter 2.1.5. beschrieben. Die Empfindlichkeitseinstellung des Detektors betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale bei 254 nm wurden zur Aufzeichnung 128-fach abgeschwächt. Papiervorschub bis zum 1. Pfeil 0.5 cm/min, bis zum 2. Pfeil 0.25 cm/min, danach 0.1 cm/min.

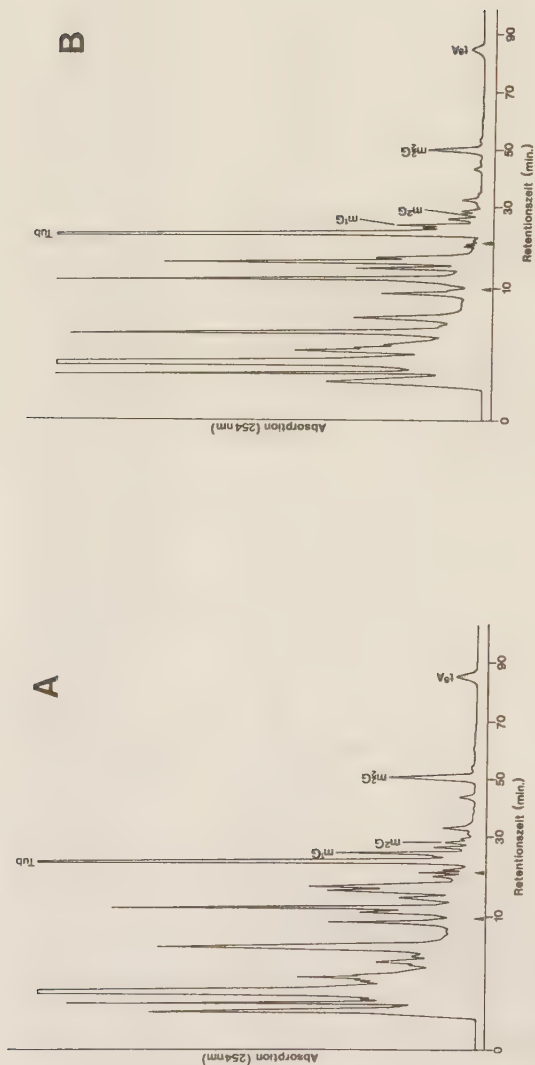


Abbildung 13:

HPLC-Trennung eines 100 µl-Aliquots der "Nucleosid-Fraktion" aus Meerkatzen-Urin (A) (entsprechend ~12.5 µl Urin) bzw. eines 200 µl-Aliquots der "Nucleosid-Fraktion" aus Rhesus-Urin (B) (entsprechend ~25 µl Urin) auf Nucleosil 120-S C₁₈ mit 10 mM Ammoniumphosphat, 4.5 % Methanol, pH 5.1. Die Vorreinigung des Urins erfolgte wie unter 2.1.5. beschrieben. Die Empfindlichkeitseinstellung des Detektors betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale bei 254 nm wurden zur Aufzeichnung 128-fach abgeschwächt. Papiervorschub bis zum 1. Pfeil 0.5 cm/min, bis zum 2. Pfeil 0.25 cm/min, danach 0.1 cm/min.

Tabelle 6:

Wiederfindung von t^6A und m_2^2G aus Human-Urin nach Vorreinigung

Herkunft des Urins	n	zugesetzte Substanz	Wiederfindung (%) $\pm$ SD der zugesetzten Substanz
Erwachsene	5	t^6A	58.6 $\pm$ 9.3
" " "	4	m_2^2G	98.8 $\pm$ 9.1
Frühgeborene	5	t^6A	53.5 $\pm$ 11.0
" " "	5	m_2^2G	110.4 $\pm$ 5.3
Erwachsene + Frühgeborene	10	t^6A	56.1 $\pm$ 10.0
	9	m_2^2G	105.2 $\pm$ 9.1

Zu 5 verschiedenen Erwachsenen- bzw. Frühgeborenen-Urinproben (600 μ l) wurden jeweils 4.35 nmol t^6A (in 10 μ l H_2O gelöst) gegeben, d.h. etwa die durchschnittlich in diesem Urinvolumen endogen vorhandene Menge (Erwachsene) bzw. etwa das Doppelte der endogenen Menge (Frühgeborene). Zur Kontrolle wurde allen Urinen gleichzeitig m_2^2G (17.65 nmol in 10 μ l 50 mM Ameisensäure gelöst) hinzugefügt, dessen Wiederfindung nach Vorreinigung des Urins nach der unter 2.1.4. beschriebenen Methode bei 100 % liegen sollte. Alle Urine wurden parallel zur Ermittlung der jeweils endogenen t^6A - bzw. m_2^2G -Mengen ohne Zusätze vorgereinigt.

Bei allen anderen untersuchten Urinproben wurden modifizierte Nucleoside ausschließlich über Phenylborsäure-Gele vorgereinigt (s. 2.1.5.).

Tabelle 7 zeigt die Wiederfindungsraten von m^1G , m^2G , m_2^2G und t^6A nach Zusatz zu einem 24 h-Pool-Urin von insgesamt 10 Ratten (Wistar).

Die Wiederfindung von t^6A im Ratten-Urin liegt bei Verwendung dieser Vorreinigungsmethode im Bereich von 100 %. Ursache für die zu hohen Wiederfindungswerte von m^1G war wahrscheinlich die unvollständige Auflösung bei der HPLC-Trennung (s. Abb. 8).

Tabelle 8 zeigt die Wiederfindungsraten von m^1G , m^2G , m_2^2G und t^6A nach Zusatz zu Tupaia-Urin und anschließender Vorreinigung über ein Phenylborsäure-Gel (s. 2.1.5.). Auch im Urin von Tupaia liegt die Ausbeute der vier modifizierten Nucleoside bei $\sim$ 100 %.

Tabelle 7:

Wiederfindung von m^1G , m^2G , m_2^2G und t^6A nach Zusatz zu Ratten-Urin

zugesezte Substanz	Anzahl der Versuche (n)	zugesezte Mengen als Vielfache der endogen in 125 μ l Urin vorliegenden Menge	Wiederfindung (%) der zugesezten Substanz
m^1G	2	3.2	128.0
"	4	6.4	125.3
"	2	12.7	112.9
	Σ 8		$\bar{x} \pm SD = 122.9 \pm 8.1$
m^2G	2	19.0	92.4
"	4	38.1	94.0
"	2	76.1	93.3
	Σ 8		$\bar{x} \pm SD = 93.3 \pm 1.2$
m_2^2G	2	1.5	95.4
"	4	3.1	102.4
"	2	6.2	97.7
	Σ 8		$\bar{x} \pm SD = 99.5 \pm 5.5$
t^6A	2	1.5	103.9
"	4	2.9	109.1
"	2	7.4	104.4
	Σ 8		$\bar{x} \pm SD = 106.9 \pm 4.7$

Zu jeweils 500 μ l (1 : 4 mit H_2O verdünntem) 24 h-Sammel-Urin von insgesamt 10 Ratten wurden die vier modifizierten Nucleoside kombiniert (in jeweils 40 μ l 3.8 mM - 15 mM Ameisensäure gelöst; unterschiedliche Konzentrationen eingebracht durch die Stammlösungen der Nucleoside) in verschiedenen Mengen zugesezt. Jeweils die geringsten (bzw. mittleren, höchsten) Vielfachen der endogen vorliegenden Mengen der vier modifizierten Nucleoside wurden gleichzeitig in Kombination zugesezt. Zur Ermittlung der Basismenge der vier modifizierten Nucleoside im untersuchten Ratten-Urin wurden 8 mal 500 μ l 1 : 4 mit H_2O verdünnte Urinproben nach Zusatz von jeweils 40 μ l entsprechend dem jeweiligen Versuch verdünnter Ameisensäure (3.8 mM - 15 mM) vorgereinigt. Endogene Mengen der vier modifizierten Nucleoside im untersuchten Urin betrugen pro 125 μ l : 612.5 pmol m^1G (dieser Wert ist wegen der für dieses Nucleosid suboptimalen Chromatographiebedingungen etwas unsicher); 92.5 pmol m^2G ; 1137.5 pmol m_2^2G ; 1187.5 pmol t^6A .

Tabelle 8:

Wiederfindung von m^1G , m^2G , m_2^2G und t^6A nach Zusatz zu Tupaia-Urin

zugesezte Substanz	Urin	Anzahl der Versuche (n)	zugesezte Menge als Vielfaches der endogen in 125 μ l Urin vorlie- genden Menge	Wiederfindung (%) der zugesezten Substanz
m^1G	1	2	1.04	123.0
"	2	2	2.20	114.6
"		Σ 4		$\bar{x}$ = 118.8
m^2G	1	2	2.81	99.0
"	2	2	6.60	97.2
"		Σ 4		$\bar{x}$ = 98.1
m_2^2G	1	2	1.30	109.6
"	2	2	2.70	101.5
"		Σ 4		$\bar{x}$ = 105.6
t^6A	1	2	3.60	111.4
"	2	2	9.30	107.7
"		Σ 4		$\bar{x}$ = 109.6

Urine 1 und 2 waren Morgen-Urine von 2 verschiedenen Tieren. Zu 500 μ l 1:4 mit H_2O verdünntem Urin 1 bzw. 2 wurden die vier modifizierten Nucleoside kombiniert in 50 μ l verdünnter Ameisensäure (8 mM bei Urin 1, 16 mM bei Urin 2) in zwei verschiedenen Mengen zugesetzt. Zur Ermittlung der endogen vorliegenden Mengen der vier modifizierten Nucleoside wurden Urin 1 und 2 nach Zugabe entsprechender Mengen verdünnter Ameisensäure vorgereinigt. Die endogenen Mengen in den untersuchten Urinen 1 bzw. 2 betrugen pro 125 μ l : 3792.7 bzw. 3618.4 pmol m^1G (die Werte sind wegen der für dieses Nucleosid suboptimalen Chromatographiebedingungen etwas unsicher); 1257.6 bzw. 1074.1 pmol m^2G ; 2707.1 bzw. 2621.7 pmol m_2^2G ; 965.9 bzw. 934.1 pmol t^6A .

Bei der Messung der Konzentrationen von m^1G , m^2G , m^2_2G und t^6A in den untersuchten Urinproben von Primaten (Saguinus, Rhesus, Javaner, Meerkatze und Pavian) wurde auf Zusätze der fraglichen Substanzen verzichtet, da die vorhandenen Urinmengen in den meisten Fällen zu gering waren. Im Gegensatz zu den über 24 h gesammelten Urinen von Ratten und den Morgen-Urinen von Tupaia's handelte es sich bei den Primaten-Urinen nämlich um Spontan-Urine. Zur Abschätzung ob die Säulenkapazität bei der Vorfraktionierung dieser Proben ausreichend war, wurden die bei der Vorfraktionierung mutmaßlich aufgetragenen Mengen der 4 modifizierten Nucleoside unter Annahme von 100 % Ausbeute rückgerechnet. Sie lagen bei allen untersuchten Primaten niedriger als diejenigen Mengen, die bei Tupaia's zu ~ 100 % wiedergefunden wurden. Demnach sollte die Säulenkapazität in allen Fällen ausgereicht haben. Es kann also davon ausgegangen werden, daß bei der Vorreinigung der 4 modifizierten Nucleoside aus Primaten-Urinen keine nennenswerten Verluste aufgetreten sind.

m^3U wurde den untersuchten Urinproben (Ratte, Tupaia, Saguinus, Pavian) zur Ausbeutebestimmung nicht gesondert zugesetzt. 3892 pmol authentisches m^3U wurden im Standardgemisch (Mengen in pmol: 1675 Ψ ; 2600 C; 1065 U; 1700 m^1A ; 4600 m^1C ; 2025 I; 1190 G; 18335 Tub; 4275 m^1I ; 3925 m^1G ; 3550 m^1_2G ; 4125 A; 8825 m^2_2G) an einem Phenylborsäure-Gel vorfraktioniert. Die Wiederfindung von m^3U betrug 104.0 ± 2.0 % ($n = 4$). Die bei Annahme von 100 % Wiederfindung berechneten m^3U -Mengen, die in den untersuchten Urinproben auf das Gel aufgegeben wurden, lagen 5 bis 10 mal niedriger als im Standardgemisch, so daß Verluste durch Überladung der Phenylborsäure-Gele auszuschließen sein dürften. Auch die Injektionsversuche bei Tupaia's (3.1.8.) sprechen für quantitative Wiederfindung nach Vorfraktionierung. Die Abbildungen 25 - 27 (S. 91, 93 u. 94) zeigen, daß die Wiederfindung von m^3U nach Injektion im Bereich derjenigen von m^2_2G liegt, für das ~ 100 % Wiederfindung nach Vorreinigung an einem Phenylborsäure-Gel ermittelt wurde (s. Tab. 8, S. 51).

3.1.2. Bestimmung von Pseudouridin aus Urin

Die zur Bestimmung der Pseudouridin-Konzentration in nativem Human-Urin entwickelte Methode (Topp et al, 1985), bei der Urin lediglich 1 : 20 verdünnt und anschließend auf Dionex DC-6A chromatographiert wird

2.1.6.), konnte ebenfalls zur Pseudouridin-Bestimmung im Urin von Ratte, Saguinus, Rhesus, Meerkatze und Javaner angewendet werden (Abb. 14 - 17). Die Trennung von Pseudouridin aus Tupaia-Urin (Abb. 15 B) war in den meisten Fällen mit dieser direkten Methode nicht befriedigend. Nach Vorreinigung von Tupaia-Urin über ein Phenylborsäure-Gel (2.1.5.) konnte Pseudouridin jedoch bei Chromatographie auf Dionex DC-6A als sauberer Peak gemessen werden.

Die in Tabelle 9 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Wiederfindung von Pseudouridin und Harnsäure nach Zusatz zu Human-Urin, Verdünnung des Urins und anschließender HPLC-Analyse bei annähernd 100 % liegt.

Tabelle 9:

Wiederfindung von Pseudouridin und Harnsäure nach Zusatz zu Human-Urin (nach Topp et al, 1985)

Herkunft des Urins	Anzahl der Versuche (n)	zugesetzte Substanz	Wiederfindung (%) $\pm$ SD der zugesetzten Substanz
Frühgeborene	10	Pseudouridin	97.6 $\pm$ 4.3
" "	12	Harnsäure	103.7 $\pm$ 5.4
Erwachsene	10	Pseudouridin	97.7 $\pm$ 5.7
" "	14	Harnsäure	107.0 $\pm$ 11.0

Zur Bestimmung der Wiederfindung von Pseudouridin wurden 10 μ l 3.34 mM Pseudouridin (in 0.1 M Ameisensäure) zu 190 μ l Urin gegeben. Der mit Pseudouridin versetzte Urin wurde entsprechend der normalen Probenvorbereitung 1 : 20 mit 10 mM Ammoniumphosphat (pH 9) verdünnt, 20 μ l (Erwachsenen-Urin) bzw. 40 μ l (Frühgeborenen-Urin) wurden auf eine Dionex DC-6A-Säule injiziert. Zur Messung der Wiederfindung von Harnsäure wurde Urin nach Zusatz von 10 μ l 6 mM Harnsäure (in 10 mM KOH) zu 190 μ l Urin ebenso weiterbehandelt. Bei 100 % Wiederfindung von Pseudouridin waren zusätzlich zur endogen vorhandenen Menge im aufgesetzten Peak bei Frühgeborenen 334 pmol und bei Erwachsenen 167 pmol zu erwarten. Für Harnsäure waren bei 100 % Wiederfindung zusätzlich zur endogen vorhandenen Menge im aufgesetzten Peak bei Frühgeborenen 600 pmol und bei Erwachsenen 300 pmol zu erwarten. Die auf die Säule injizierten verdünnten Urinproben enthielten ohne Zusätze durchschnittlich bei Frühgeborenen 340 ± 140 pmol Pseudouridin und 2453 ± 961 pmol Harnsäure und bei Erwachsenen 150 ± 92 pmol Pseudouridin und 1791 ± 1095 pmol Harnsäure.

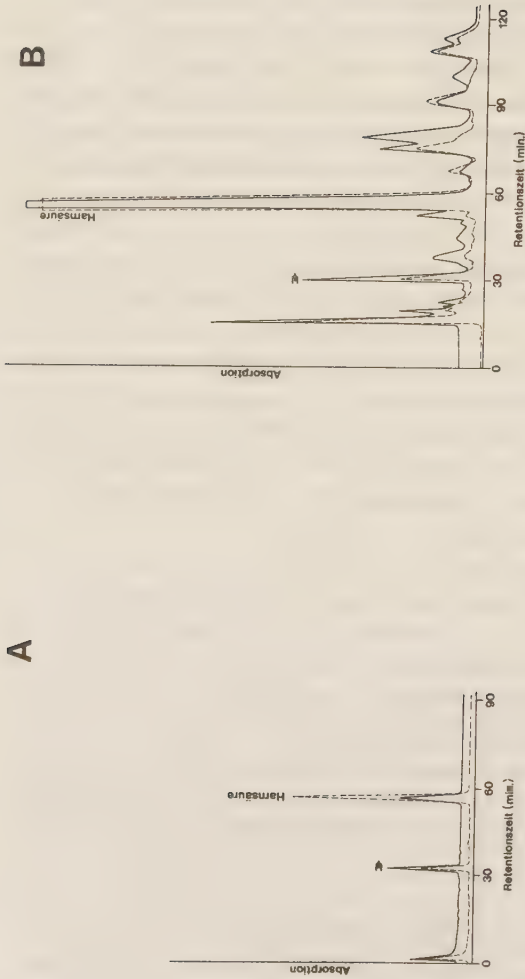


Abbildung 14:

(A) HPLC-Trennung von Pseudouridin- und Harnsäure-Standards. Chromatographie-Bedingungen s. 2.1.6. 326 pmol Pseudouridin und 600 pmol Harnsäure, gelöst in 100 μ l Elutionspuffer, wurden injiziert. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.005 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung 128-fach abgeschwächt. (B) HPLC-Trennung von Pseudouridin und Harnsäure aus 20 μ l 1 : 20 verdünntem Human-Urin (Erwachsener). Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.005 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung 64-fach abgeschwächt. (—) Aufzeichnung bei 254 nm, (---) Aufzeichnung bei 280 nm. Papiervorschub 0.1 cm/min.

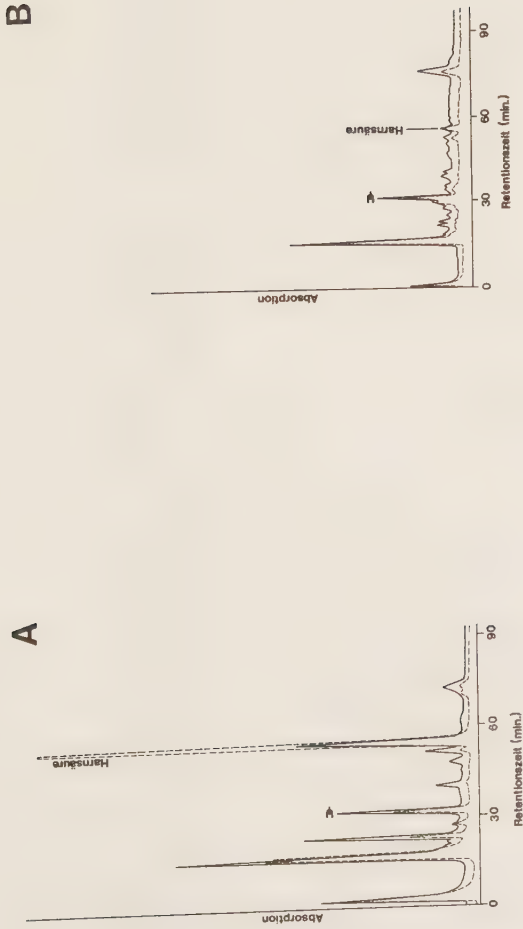


Abbildung 15:

HPLC-Trennung von Pseudouridin und Harnsäure aus 20 μ l eines 1 : 20 verdünnten Ratten-Urins (A) bzw. aus 10 μ l eines 1 : 20 verdünnten Tupaia-Urins (B). Chromatographie-Bedingungen s. 2.1.6. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.005 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung 128-fach abgeschwächt. (—) Aufzeichnung bei 254 nm, (---) Aufzeichnung bei 280 nm. Papiervorschub 0.1 cm/min.

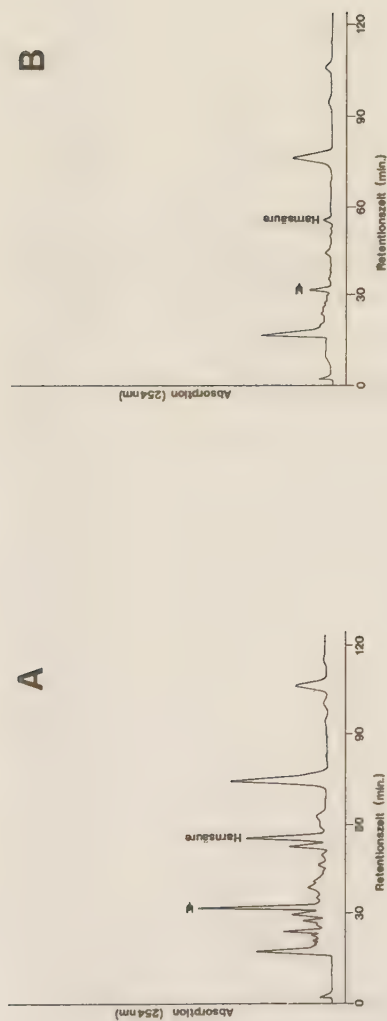


Abbildung 16:

HPLC-Trennung von Pseudouridin und Harnsäure aus 10 μ l eines 1 : 20 verdünnten Saguinus-Urins (A) bzw. aus der gleichen Menge eines ebenso verdünnten Rhesus-Urins (B). Chromatographie-Bedingungen s. 2.1.6. Die Detektor-empfindlichkeitseinstellung (254 nm) betrug 0.005 AUFS. Die Signale wurden zur Aufzeichnung 128-fach abgeschwächt. Papiervorschub 0.1 cm/min.

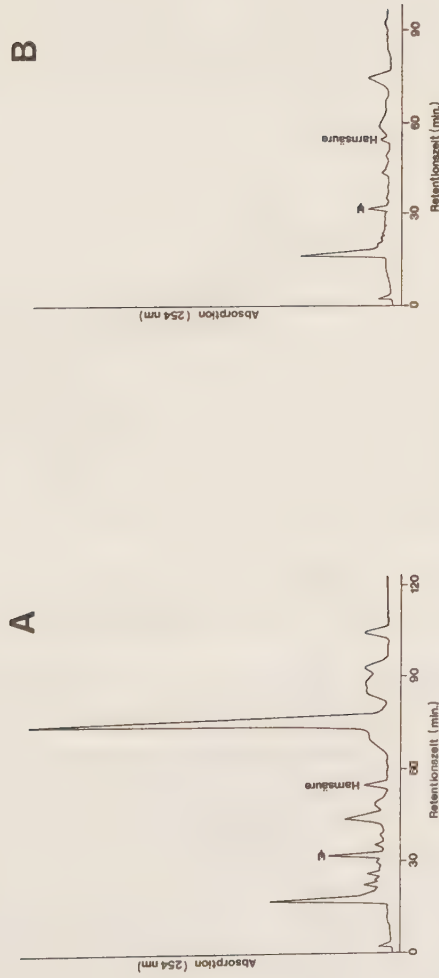
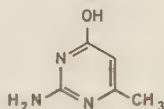


Abbildung 17:

HPLC-Trennung von Pseudouridin und Harnsäure aus 10 μ l eines 1 : 20 verdünnten Meerkatzen-Urins (A) bzw. aus der gleichen Menge eines ebenso verdünnten Javaner-Urins (B). Chromatographie-Bedingungen s. 2.1.6. Die Detektorempfindlichkeitseinstellung (254 nm) betrug 0.005 AUFS. Die Signale wurden zur Aufzeichnung 128-fach abgeschwächt. Papiervorschub 0.1 cm/min.

3.1.3. Bestimmung modifizierter Nucleobasen aus Urin

Die von Schöch & Heller-Schöch (1977) in Anlehnung an Uziel et al (1968) und Gassen & Leifer (1970) entwickelte HPLC-Methode zur Trennung modifizierter Nucleobasen aus Urin mittels eines Kationenaustauscher-Harzes konnte unter Verwendung des Harzes Dionex DC-6A weiterentwickelt werden (2.1.6.; Abb. 18). Zusätzlich gelang es, eine Substanz zu finden, die in Urin nicht vorkommt und somit als externer Standard geeignet ist:



2 - Amino - 4 - hydroxy - 6 - methylpyrimidin
(6 - Methylisocytosin)

6-Methylisocytosin eluiert bei der HPLC von vorfraktioniertem Urin an dem Kationenaustauscher-Harz Dionex DC-6A deutlich getrennt von den aus Urin stammenden Substanzen. Mit Hilfe dieses externen Standards wurden die Ausbeuten der modifizierten Nucleobasen aus Human-Urin korrigiert (Sander et al, 1985; Sander et al, 1986a).

Da diese Methode neu entwickelt wurde, werden im folgenden einige Chromatographie-Parameter der Nucleobasentrennung vorgestellt.

Tabelle 10 (S. 60) zeigt das Auflösungsvermögen und die Effizienz der Analysatorsäule für die aus Urin bestimmten Substanzen. Die Trennschärfe eines Chromatographie-Systems läßt sich anhand der Auflösung jeweils zweier benachbarter Peaks a und b, ausgedrückt durch den "resolution factor" (R_w), berechnen (Singhal, 1974). Der "resolution factor" ergibt sich aus der Beziehung $R_w = (V_b - V_a) / (W_b + W_a)$. V ist das Volumen des Elutionsmittels, das vom Beginn der Elution bis zum Erscheinen des Peak-Maximums durch die Säule gefördert werden muß. W bezeichnet die Halbwertsbreite eines Peaks, d.h. die Breite bei 50 % der maximalen Peak-Höhe. Bei konstanter Fließgeschwindigkeit des Eluenten lassen sich für die einzelnen Glieder der Formel auch die Zeiten verwenden, in denen die entsprechenden Volumina die Säule passiert haben, d.h. bei Aufzeichnung einer HPLC-Trennung mit konstantem Papiervorschub können in die

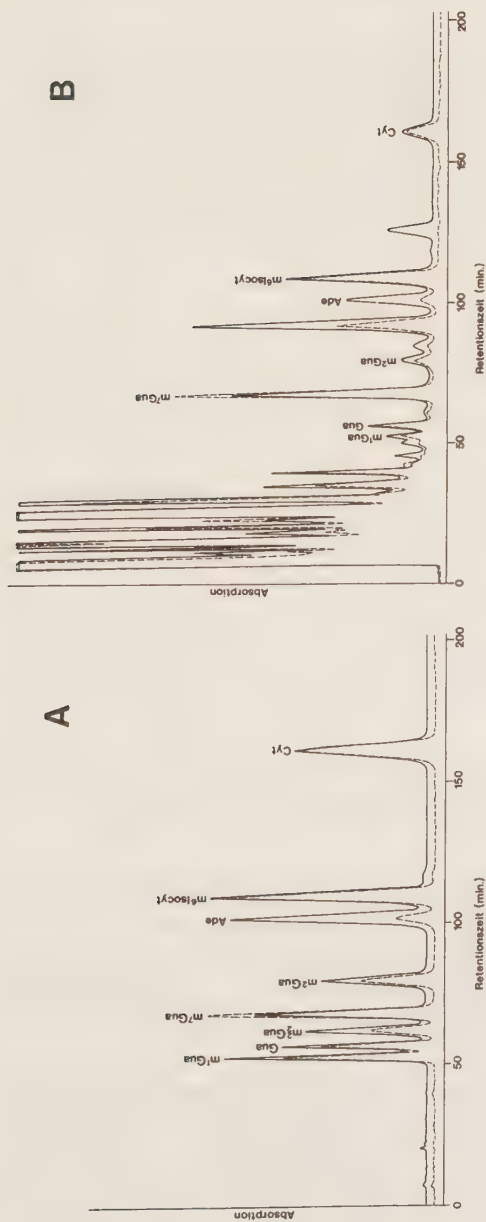


Abbildung 18:

(A) HPLC-Trennung von Nucleobasen-Standards auf Dionex DC-6A. Folgende Mengen (pmol) wurden injiziert:

m¹Gua 616; Gua 422; m²Gua 250; m⁷Gua 1128; m²Gua 404; Ade 758; m⁶Isocyt 1980; Cyt 1924.

(B) HPLC-Trennung der ³Nucleobasenfraktion⁸ (s. 2.1.4.) aus Human-Urin. Dem Injektionsvolumen von 20 µl ³Nucleobasenfraktion⁸ entsprachen ~9.7 µl Urin. Chromatographie-Bedingungen s. 2.1.6. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung (— 254 nm; ---280 nm) 128-fach abgeschwächt. Papiervorschub 0.1 cm/min.

Formel auch die entsprechenden Strecken (in mm) eingesetzt werden, die sich auf dem Chromatogramm messen lassen. Zwei benachbarte Peaks können bei einem $R_w = 1$ noch gut quantifiziert werden, wenn das Mengenverhältnis der zu trennenden Substanzen 100 : 1 beträgt (Singhal, 1974). Tabelle 10 zeigt, daß die R_w -Werte für die aus Urin bestimmten Nucleobasen im Standardgemisch alle über 1 liegen (vgl. Abb. 18A).

Tabelle 10:

Auflösungsvermögen und Effizienz der Analysatorsäule zur Trennung von Nucleobasen

Auflösung von benachbarten Substanzen		R_w	Höhe der theoretischen Böden HEPT (mm)	
m ¹ Gua	- Gua	1.1	m ¹ Gua	0.048
Gua	- m ² Gua	1.3	Gua	0.042
m ² Gua	- m ⁷ Gua	1.3	m ² Gua	0.055
m ⁷ Gua	- m ⁸ Gua	2.3	m ⁷ Gua	0.042
m ⁸ Gua	- Ade	3.8	m ⁸ Gua	0.049
Ade	- m ⁶ Isocyt	1.4	Ade	0.030
m ⁶ Isocyt	- Cyt	7.4	m ⁶ Isocyt	0.026
			Cyt	0.025

Für jede einzelne zu trennende Substanz läßt sich die Effizienz der Analysatorsäule durch die "Höhe der theoretischen Böden", das heißt die Strecke, auf welcher sich ein chromatographisches Gleichgewicht einmal einstellt ("HETP" = height-equivalent of a theoretical plate), berechnen. Die Anzahl der theoretischen Trennstufen (Böden) einer Säule für bestimmte Substanzen ist um so größer, je kleiner die entsprechenden HETP-Werte sind. Dabei wird bei gleichen Säulendimensionen die Trennung eines Substanz-Gemisches um so besser, je mehr theoretische Böden eine Säule besitzt. Der HETP-Wert wird durch folgende Gleichung bestimmt (Singhal, 1974): $HETP = 0.18 (W/V_x)^{2/3} L$.

V_x ist das Volumen, welches vom Beginn der Elution bis zum Erreichen der Peak-Mitte durch die Säule gefördert werden muß (ausschließlich

des Volumens vom Aufgabeventil bis zum Säulenanfang bzw. vom Säulenende bis zum Detektor). W bezeichnet die Halbwertsbreite des entsprechenden Peaks, L die Höhe der Säulenfüllung in mm. Anhand der HETP-Werte lassen sich jeweils für einzelne Substanzen Chromatographie-Bedingungen und Säulenfüllungen miteinander quantitativ vergleichen. Die HETP-Werte für die untersuchten Nucleobasen (Tab. 10) liegen allgemein etwas niedriger als bei dem von Schöch & Heller-Schöch (1977) ursprünglich entwickelten Verfahren zur Trennung modifizierter Nucleobasen auf dem Kationenaustauscher-Harz Beckman M 71.

Abbildungen 18B (s.o.) sowie 19-22 (s.u.) zeigen HPLC-Trennungen der nucleobasenhaltigen Fraktion aus Human-, Ratten-, Tupaia- und Primaten-Urin. Während im Human-Urin m^1Gua gut erkennbar ist (Abb. 18B), konnte im Ratten-Urin kein deutlicher Peak in der m^1Gua -Position gefunden werden (Abb. 19A, vor allem die Aufzeichnung bei 280 nm). Geringe Mengen m^1Gua könnten allerdings durch den vorhergehenden Peak verdeckt sein. Auch in der "Nucleobasenfraktion" aus Tupaia-, Rhesus- und Pavian-Urin ist in der m^1Gua -Position kein Peak erkennbar (s. Abb. 19B, 21B und 22). Bei den übrigen untersuchten Primaten-Urinen dürfte es sich wohl bei der kleinen Schulter des Peaks bei 50 min um m^1Gua handeln (s. Abb. 20A,B, 21A).

Außer bei Ratten und Rhesus konnte bei allen untersuchten Spezies m^2Gua als Ausscheidungsprodukt im Urin identifiziert werden.

In der Position von m^2Gua findet sich in den Chromatogrammen bei allen untersuchten Spezies mit Ausnahme von Tupaia ein Peak, der aber nicht das für m^2Gua spezifische Wellenlängenverhältnis (254 nm/280 nm) aufweist. Daß eventuell geringfügige Mengen an m^2Gua durch diesen Peak überdeckt werden, kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Wiederfindung für die in Human-Urin untersuchten modifizierten Nucleobasen liegt nach Vorreinigung des Urins mit der verwendeten Methode (2.1.4.; Abb. 4, S. 27) bei ~100 % (Sander et al, 1985). Tabelle 11 (S. 66) zeigt die Wiederfindung des neu eingeführten externen Standards $m^6Isocyt$ im Vergleich zu Cyt nach Zusatz zu insgesamt 20 verschiedenen Human-Urinen (von 8 Frühgeborenen und 12 Erwachsenen).

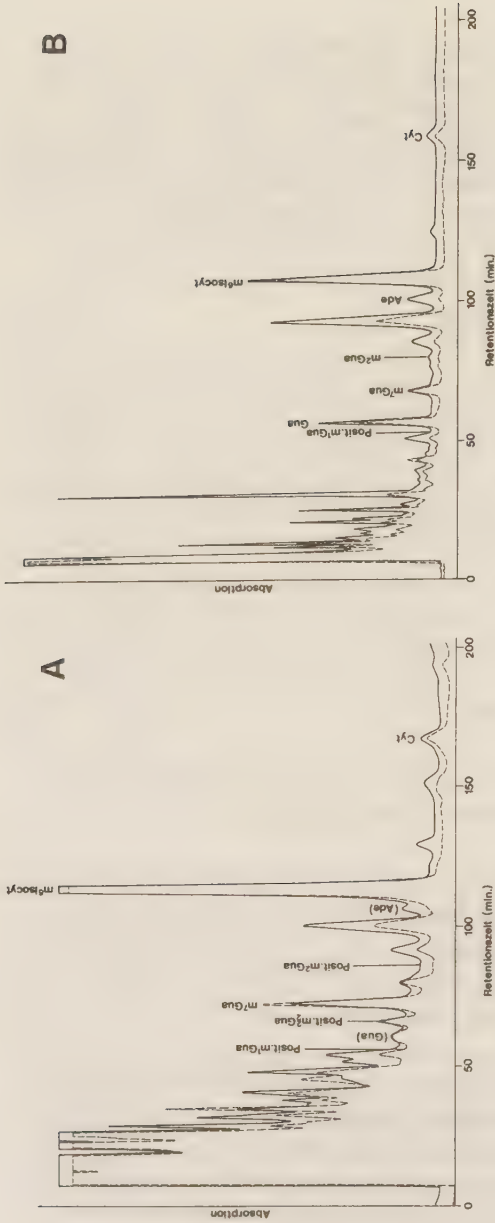


Abbildung 19:

HPLC-Trennung der nucleobasenhaltigen Fraktion (2.1.4.) aus 24 h-Ratten-Urin (A) bzw. von 24 h-Tupaia-Urin (B). Den Injektionsvolumina von 80 μ l (Ratte) bzw. 20 μ l (Tupaia) "Nucleobasenfraktion" entsprachen $\sim$ 9.7 μ l bzw. $\sim$ 2 μ l Urin. Chromatographie-Bedingungen s. 2.1.6. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung (— 254 nm; ---280 nm) 128-fach abgeschwächt. Papier-vorschub 0.1 cm/min.

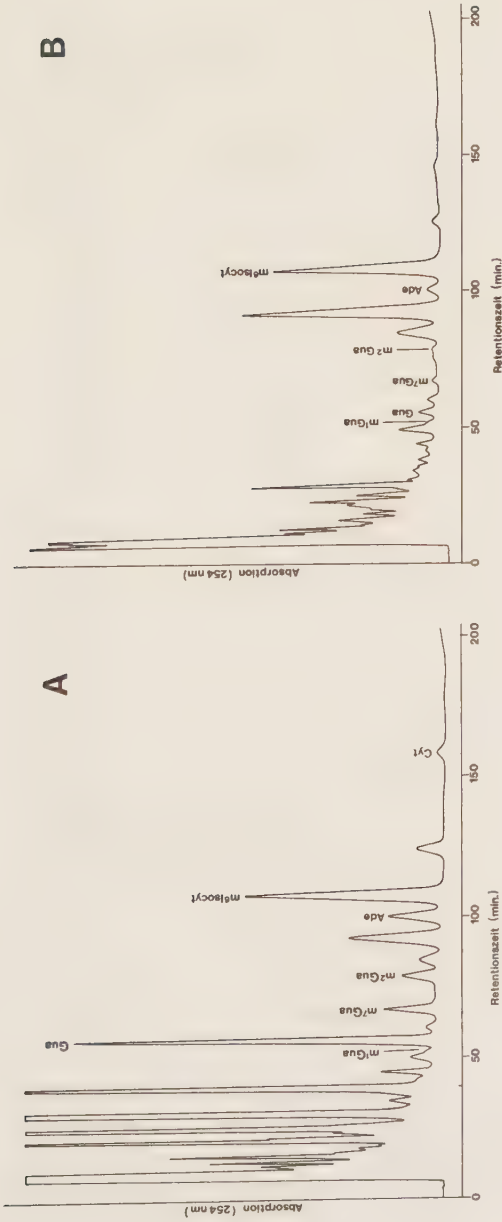


Abbildung 20:

HPLC-Trennung der nucleobasehaltigen Fraktion (2.1.4.) aus Saguinus-Urin (A) bzw. Javaner-Urin (B). Den Injektionsvolumina von jeweils 20 μ l "Nucleobasenfraktion" entsprachen jeweils $\sim 2.2 \mu$ l Urin. Chromatographie-Bedingungen s. 2.1.6. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung 128-fach abgeschwächt. Papiervorschub 0.1 cm/min.

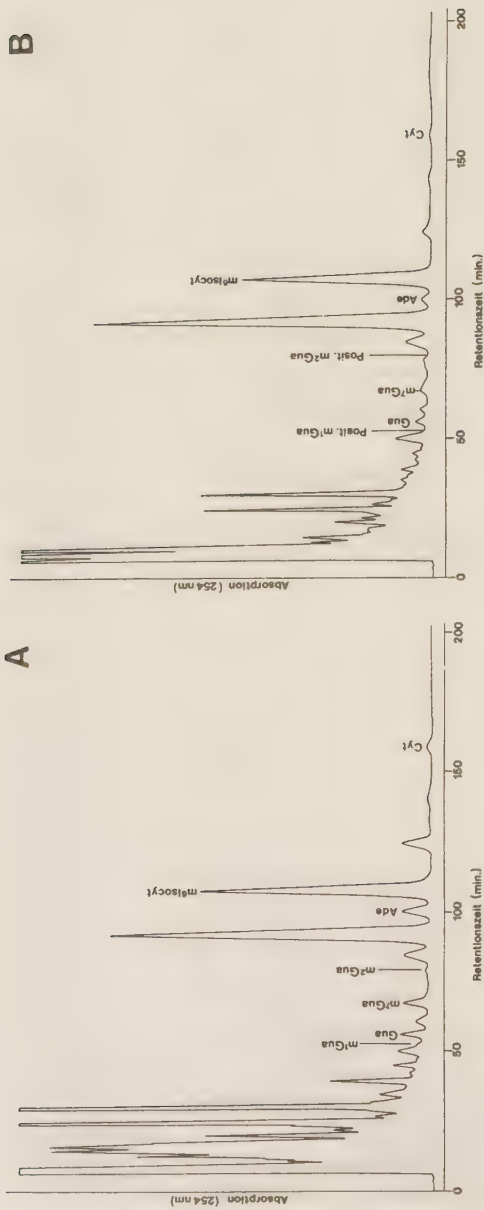


Abbildung 21:
 HPLC-Trennung der nucleobasenhaltigen Fraktion (2.1.4.) aus Meerkatzen-Urin (A) bzw. Rhesus-Urin (B). Den Injektionsvolumina von jeweils 20 µl "Nucleobasenfraktion" entsprachen jeweils ~ 2.2 µl Urin. Chromatographie-Bedingungen s. 2.1.6. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung 128-fach abgeschwächt. Papiervorschub 0.1 cm/min.

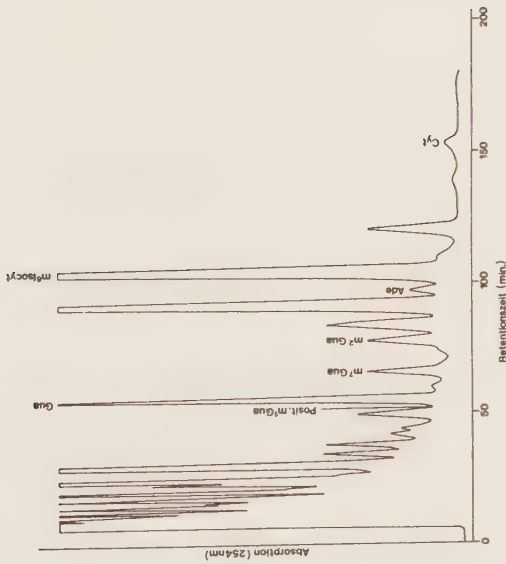


Abbildung 22:
HPLC-Trennung der nucleobasehaltigen Fraktion (2.1.4.) aus Pavian-Urin. Dem Injektionsvolumen von 40 μ l "Nucleobasenfraktion" entsprachen $\sim 4.4 \mu$ l Urin. Chromatographie-Bedingungen s. 2.1.6. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.002 AUFS. Die Ausgangssignale wurden zur Aufzeichnung 64-fach abgeschwächt. Papier-vorschub 0.1 cm/min.

Cytosin wurde als Beispiel ausgewählt, da dieses sich während der Vorfraktionierung ähnlich verhält wie die anderen untersuchten Nucleobasen und da es zudem auf der Dionex-Säule besonders gut abgetrennt wird (Sander et al, 1985). Den Urinproben wurden vor der Vorfraktionierung je 10 µl 10 mM m⁶Isocyt (in H₂O) und 10 µl 9.6 mM Cyt (in 0.1 M Ameisensäure) zugesetzt. Die Wiederfindung von m⁶Isocyt liegt wie diejenige von Cyt bei ~ 100 %. Somit eignet sich m⁶Isocyt als externer Standard, der dem Nativ-Urin zugesetzt wird.

Tabelle 11:

Wiederfindung von m⁶Isocyt und Cyt nach Zusatz zu Human-Urin

zugesetzte Substanz	Wiederfindung (%) ± SD der zugesetzten Substanz
m ⁶ Isocyt	101.8 ± 4.9
Cyt	105.5 ± 7.5

Während zur Vorreinigung modifizierter Nucleobasen aus Human-Urin 600 µl Urin verwendet wurden (s. 2.1.4.), mußte der 24 h-Ratten-Urin zuvor 1 : 4 mit H₂O verdünnt werden (150 µl Urin + 450 µl H₂O), um quantitative Ausbeuten zu erhalten.

In Tabelle 12 ist die Wiederfindung für die in Ratten-Urin untersuchten modifizierten Nucleobasen dargestellt. Die Wiederfindungsraten von m¹Gua, m²Gua und m⁷Gua sowie für m⁶Isocyt (externer Standard) liegen alle bei ~ 100 %. Das Fehlen von m²Gua und wahrscheinlich auch von m¹Gua im Ratten-Urin (geringe Mengen m¹Gua könnten durch den vorhergehenden Peak bei der HPLC verdeckt sein, s. Abb. 19A, S. 62) ist daher nicht auf Verluste durch die Vorreinigung zurückzuführen.

Tabelle 13 (S. 68) zeigt die Wiederfindung der in Tupaia-Urin bestimmten modifizierten Nucleobasen nach deren Zusatz zu Urin. Obwohl die mit verdünntem Tupaia-Urin auf die Säule aufgegebene m⁷Gua-Menge im Bereich derjenigen lag, die mit verdünntem Ratten-Urin zur Vorreinigung auf das Harz aufgegeben wurde (vgl. Legendes zu Tab. 12 u. 13),

Tabelle 12:

Wiederfindung von m¹Gua, m²Gua, m⁷Gua und m⁶Isocyt nach Zusatz zu Ratten-Urin

zugesezte Substanz	Anzahl der Versuche (n)	zugesezte Menge (nmol)	zugesezte Menge als Vielfaches der endo- gen in 150 µl Urin vorhandenen Menge	Wiederfindung (%) der zugesezten Substanz
m ¹ Gua	2	0.77	-	100.9 °
"	4	1.54	-	103.5 °
"	2	3.00	-	96.9
"	2	6.16	-	95.1
"	Σ 10			$\bar{x} \pm SD = 100 \pm 5.8$
m ² Gua	4	0.51	-	104.9
"	4	1.01	-	102.3
"	2	2.12	-	106.0
"	2	4.04	-	101.7
"	Σ 12			$\bar{x} \pm SD = 103.7 \pm 4.1$
m ⁷ Gua	4	5.64	0.5	95.2
"	4	28.20	2.3	108.8
"	2	56.40	4.6	103.6
"	2	84.60	6.8	102.2
"	Σ 12			$\bar{x} \pm SD = 102.3 \pm 7.9$
m ⁶ Isocyt	12	100.0	-	$\bar{x} \pm SD = 94.3 \pm 3.6$

- : endogen nicht gefunden

° : diese Werte sind etwas unsicher, da die HPLC-Trennung von m¹Gua nicht optimal war.

Zu jeweils 600 µl 1 : 4 mit H₂O verdünntem 24 h-Sammelurin von insgesamt 10 Ratten wurden die drei modifizierten Guaninderivate kombiniert in verschiedenen Mengen zugesezt. Dabei wurden jeweils die geringsten (bzw. zweithöchsten, dritthöchsten, höchsten) Mengen der drei Verbindungen kombiniert gleichzeitig zugesezt. Der m⁶Isocyt-Zusatz war immer gleich. Die Guaninderivate wurden jeweils in 90 µl unterschiedlich verdünnter Ameisensäure zugesezt (3.9 mM - 44.4 mM). Den Kontrollen wurden entsprechende Mengen verdünnter Ameisensäure zugesezt. Die Vorreinigung erfolgte wie unter 2.1.4. beschrieben. In 150 µl Ratten-Urin waren ohne Zusätze endogen folgende Mengen der modifizierten Nucleobasen enthalten: m¹Gua endogen wahrscheinlich nicht vorhanden (s. Abb. 19A); m²Gua endogen nicht vorhanden; m⁷Gua 12.39 nmol.

Tabelle 13:

Wiederfindung von m¹Gua, m²Gua, m³Gua und m⁴Isocyt nach Zusatz zu Tupaia-Urin

zuge- setzte Substanz	Urin	Anzahl der Versuche (n)	zuge- setzte Menge (nmol)	zugesezte Menge als Vielfaches der endogen in 125 µl Urin vor- handenen Menge	Wiederfindung (%) der zugesetzten Substanz
m ¹ Gua	1	2	1.54	-	85.9
"	2	2	3.08	-	79.8
"		Σ 4			$\bar{x} = 82.9$
m ² Gua	1	2	1.01	0.7	66.8
"	2	2	2.02	1.3	74.7
"		Σ 4			$\bar{x} = 70.8$
m ³ Gua	1	2	28.20	2.5	77.3
"	2	2	28.20	2.4	69.6
"		Σ 4			$\bar{x} = 73.5$
m ⁴ Isocyt	1	2	100	-	
"	2	2	100	-	$\bar{x} \pm SD = 91.1 \pm 3.7$
"		Σ 4			

- : endogen nicht gefunden.

Zu jeweils 500 µl 1 : 4 mit H₂O verdünntem Morgen-Urin von zwei verschiedenen Tieren (Urin 1 und 2) wurden die Guaninderivate kombiniert in verschiedenen Mengen zugesetzt. Dabei wurden die geringeren Mengen kombiniert zu Urin 1, die größeren Mengen kombiniert zu Urin 2 zugesetzt. Die Guaninderivate waren in 30 µl 36.7 mM Ameisensäure (Urin 1) bzw. 40 mM Ameisensäure (Urin 2) gelöst. Den Kontrollen wurden entsprechende Mengen verdünnter Ameisensäure zugesetzt. Der m⁴Isocyt- Zusatz war immer gleich. Die Vorreinigung erfolgte wie unter 2.1.4. beschrieben (mit der Änderung, daß der Urin 1 : 4 anstatt 1 : 5 verdünnt wurde und daß aus dem Ansatz 1000 µl anstatt des gesamten Ansatzes auf das Harz aufgetragen wurden). In 125 µl Tupaia-Urin (1 bzw. 2) waren ohne Zusätze endogen folgende Mengen modifizierter Nucleobasen enthalten (nach Ausbeutekorrektur über die Mittelwerte der prozentualen Wiederfindung): m¹Gua endogen nicht vorhanden; m²Gua 1.36 bzw. 1.59 nmol; m³Gua 11.3 bzw. 11.8 nmol.

lagen die Ausbeuten für die zugesetzten Guaninderivate bei *Tupaia*s allgemein nur zwischen 70 und 80 %, während das *m*⁶Isocyt durchschnittlich zu 90 % wiedergefunden wurde.

Für die Wiederfindungsraten der Nucleobasen aus Primaten-Urin gilt Entsprechendes wie oben (S. 52) für die Nucleoside beschrieben, d. h., daß auch hier größere Verluste bei der Vorreinigung nicht aufgetreten sein dürften. Ebenso wurde der externe Standard *m*⁶Isocyt bei den 5 untersuchten Primaten-Urinen zu durchschnittlich 92.4 ± 7.8 % wiedergefunden.

3.1.4. Modifizierte RNA-Kataboliten aus dem Abbau von tRNA

Im folgenden wird bei verschiedenen Spezies die Ausscheidung einiger modifizierter RNA-Kataboliten im Urin verglichen, die aus dem Abbau von tRNA stammen und die bei Säugern für diese RNA-Klasse spezifisch sind (Einschränkung: *m*²G bzw. *m*²Gua; vgl. Tab. 14). Zunächst wurde geprüft, bei welchen Spezies die untersuchten modifizierten tRNA-Kataboliten als Nucleoside bzw. Nucleobasen im Urin nachweisbar waren (Tab. 14). Die

Tabelle 14:

Im Urin bestimmte modifizierte tRNA-Kataboliten

Gattung	t ⁶ A	<i>m</i> ₂ ² G	<i>m</i> ¹ G	<i>m</i> ¹ Gua	<i>m</i> ² G ^a	<i>m</i> ² Gua ^a
frühgeborener Mensch	+	+	+	+	+	+
erwachsener Mensch	+	+	+	+	+	+
<i>Saguinus</i>	+	+	+	+	+	+
Rhesus	+	+	+	-	+	-
Javaner	+	+	+	+	+	+
Meerkatze	+	+	+	+	+	+
Pavian	+	+	+	-	+	+
<i>Tupaia</i>	+	+	+	-	+	+
Ratte	+	+	+	-	+	-

^a kommt auch in U6-RNA vor (Busch et al, 1982); der Anteil an ausgeschiedenem *m*²G bzw. *m*²Gua aus U6-RNA an der Gesamtausscheidung ist aber wahrscheinlich sehr gering (Sander et al, 1986a; Schöch et al, 1988a).

Ausscheidung von t⁶A wurde ausschließlich auf der Stufe des Nucleosids untersucht. Es wurde beschrieben, daß t⁶A bei Mensch und Ratte annähernd quantitativ in Urin ausgeschieden wird (Hong et al, 1973).

Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß für eine Quantifizierung der Ausscheidung der modifizierten tRNA-Bausteine m¹G und m²G die entsprechenden Nucleobasen im Urin der meisten hier untersuchten Spezies mitbestimmt werden müssen. Ob von Fall zu Fall geringe Mengen m²Gua ausgeschieden werden, kann nicht sicher ausgeschlossen werden, da bei der HPLC-Trennung der Nucleobasen in der Position von m²Gua ein Störpeak erscheint, der u.U. geringe Mengen m²Gua überdecken könnte. Dieser Peak fehlte bei vorgereinigtem Tupaia-Urin (s. Abb. 19 B, S. 62), ohne daß sich bei dieser Spezies m²Gua nachweisen ließe.

Tabelle 15 zeigt die in Urinen von Säugern bestimmten Konzentrationen bzw. die innerhalb von 24 h ausgeschiedenen Mengen der untersuchten tRNA-Kataboliten. Die in Human-Urin gemessenen Konzentrationen sind auf Kreatinin bezogen dargestellt. Der Kreatinin-Bezug ermöglicht die vergleichende Bewertung von Spontanurinproben anstelle von 24 h-Urinen. Kreatinin wird nämlich in einer nichtenzymatischen Reaktion aus dem Kreatin bzw. Kreatinphosphat des Muskels gebildet und sehr gleichförmig über die 24 h des Tages durch Niere ausgeschieden. Der Bezug auf Kreatinin entspricht daher einem Bezug auf die Muskelmasse, die z.B. bei Frühgeborenen etwa 20 %, bei Erwachsenen etwa 45 % der Körpermasse ausmacht. Die auf die jeweilige Kreatinin-Konzentration bezogenen Konzentrationen von modifizierten RNA-Kataboliten sind somit beim gesunden Menschen unabhängig von der Verdünnung des Urins durch unterschiedliche Diurese und daher sowohl in verschiedenen Spontan-Urinen der gleichen Person als auch in Spontan-Urinen verschiedener Personen gleichen Alters weitgehend konstant (Schöch & Heller-Schöch, 1977).

Für Ratten und Tupaias sind die Ausscheidungswerte in nmol/24h/Tier angegeben. Die Bestimmungen bei Ratten wurden an einem gemischten Urin von insgesamt 10 Tieren durchgeführt. Die Werte für Tupaias wurden von 4 Tieren ermittelt. Von jedem Tier wurde die Ausscheidung an 3 Tagen gemessen.

Tabelle 15:

Ausscheidung einiger modifizierter tRNA-Kataboliten im Urin von Säugern

	Anzahl der Urine (n)	Substanzen		
		t ^{6A}	m ₂ ⁶	m ¹ ⁶ + m ¹ ⁶ ua
erwachsener Mensch ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin)	32	0.43 $\pm$ 0.09 (n = 15)	1.43 $\pm$ 0.39	1.34 $\pm$ 0.54
frühgeborener Mensch ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin)	38	3.87 $\pm$ 0.89 (n = 21)	9.43 $\pm$ 1.87	5.50 $\pm$ 1.95
Ratte (nmol/24h/Tier)	10	167.27	160.22	86.27
Tupaia (nmol/24h/Tier)	12	26.76 $\pm$ 7.63	74.43 $\pm$ 21.73	60.50 $\pm$ 17.06
Saguinus ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	1	25.06	53.98	72.44
Rhesus ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	1	3.68	7.96	4.98
Javaner ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	1	2.99	6.17	8.42
Meerkatze ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	1	12.71	28.35	20.66
Pavian ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	1	15.56	32.88	39.74
				43.50

Von den Primaten standen nur einzelne Spontan-Urine zur Verfügung. Hier werden unmittelbar die gemessenen Konzentrationen angegeben.

Anhand dieser Meßwerte wurde geprüft, ob die bei den untersuchten Säuger-Spezies im Urin gefundenen Mengenverhältnisse der modifizierten Kataboliten zueinander denjenigen entsprechen, welche für diese modifizierten Bausteine in cytoplasmatischer tRNA durchschnittlich vorliegen (s. Tab. 1, S. 5).

Die durchschnittliche Nucleotid-Zusammensetzung von cytoplasmatischer tRNA wurde wie folgt ermittelt. Zunächst wurde anhand von publizierten Sequenzanalysen (Sprinzl et al, 1985) von insgesamt 64 ausgewählten eukaryontischen cytoplasmatischen tRNAs eine durchschnittliche Zusammensetzung für tRNAs mit jeweils gleichem Anticodon ermittelt, wobei Sequenzen für tRNAs mit insgesamt 32 verschiedenen Anticodons berücksichtigt wurden (Sander et al, in Vorbereitung; Schöch et al, 1988a). Es wurden, wenn vorhanden, Sequenzen von Säuger-tRNAs verwendet (47 von insgesamt 64), andernfalls mußte auf tRNA-Sequenzen von Huhn, Bombyx mori, Hefen und ein bei Mäusen vorkommendes Virus (M-Mulv.) zurückgegriffen werden (vgl. 1.1., S. 4).

Anschließend wurde unter der in der Einleitung (1.1., S. 4 und 6) erläuterten Annahme, daß ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit des Vorkommens einer bestimmten tRNA in einem Organismus und der Häufigkeit des bzw. der (wobble) dem jeweiligen Anticodon entsprechenden Codons in Protein-codierenden Genen besteht (Garell, 1976; Chevallier & Garell, 1979; Hentzen et al, 1981; Garell, 1982; Ikemura, 1982; Chevallier & Garell, 1982; Ikemura 1985), das durchschnittliche Vorkommen jedes Nucleosids nach der folgenden Formel (aus Schöch et al, 1988a), berechnet:

$$\bar{N} = \frac{N_1 n_1 + N_2 n_2 + \dots + N_i n_i}{n_1 + n_2 + \dots + n_i}$$

N_i ist die durchschnittliche Anzahl der Reste des betrachteten Nucleosids pro tRNA mit einem bestimmten Anticodon (Mittelwert aus den berücksichtigten Sequenzanalysen). In der Regel handelt es sich dabei um ganzzahlige Werte, da homologe tRNAs bei verschiedenen Säugern meist weitgehend übereinstimmende Sequenzen aufweisen. n_i ist die Anzahl der

dem Anticodon entsprechenden Codons in 39 menschlichen Genen (insgesamt 10807 Codons; Ikemura, 1985; Maruyama et al, 1986). Für 6 der insgesamt 61 verschiedenen "Sinn"-Codons (GCG, Ala; CAA, Gln; UUA, Leu; UCG, Ser; ACG, Thr; GUG, Val) waren allerdings keine Sequenzanalysen von tRNAs mit passendem Anticodon verfügbar, so daß nur 10119 Codons berücksichtigt wurden (Sander et al, in Vorbereitung). Die Zahlen der Tabelle 1 (S. 5) wurden auf diesem Wege ermittelt. Die obere Zeile von Tabelle 16 zeigt auszugsweise nochmals das so errechnete durchschnittliche Vorkommen derjenigen modifizierten Bausteine in cytoplasmatischer tRNA, die im Urin verschiedener Spezies bestimmt wurden.

In der unteren Zeile ist zum Vergleich das durchschnittliche Vorkommen dieser modifizierten Nucleoside für die gleichen tRNAs ohne Berücksichtigung von Codon-Häufigkeiten dargestellt. Wie der Vergleich zeigt, unterscheidet sich die so berechnete durchschnittliche Anzahl der Reste pro tRNA-Molekül nicht wesentlich von derjenigen, die unter Berücksichtigung von Codon-Häufigkeiten ermittelt wurde. Für die gezeigten Nucleoside, die sämtlich in einer größeren Zahl von tRNA-Spezies vorkommen, war dies zu erwarten. Die Berücksichtigung der Codon-Häufigkeit kann umso wichtiger werden, je seltener das betrachtete Nucleosid bzw. die betreffenden tRNA-Spezies sind.

Tabelle 16:

Für cytoplasmatische tRNA bei "Säugetern" berechnete durchschnittliche Verteilung einiger modifizierter Nucleoside (nach Schöch et al, 1988a)

	<u>Reste/Molekül</u>			
	t ⁶ A	m ² G	m ¹ G	m ² G
Codon-Häufigkeiten berücksichtigt	0.224	0.501	0.519	0.765
Codon-Häufigkeiten nicht berücksichtigt	0.235	0.402	0.626	0.805

Da für t^4A quantitative Ausscheidung bei Mensch und Ratte beschrieben wurde (Mong et al, 1973), lag es nahe, die in Urin bestimmten tRNA-Kataboliten (Tab. 15) auf $t^4A = 1$ zu normieren und mit der berechneten durchschnittlichen Verteilung der gleichen Bausteine in cytoplasmatischer tRNA von "Säugetern" (auch auf $t^4A = 1$ normiert) zu vergleichen (Tab. 17). Unter der Annahme, daß t^4A generell bei den untersuchten Spezies quantitativ ausgeschieden wird, läßt sich so die Wahrscheinlichkeit einer quantitativen Ausscheidung bzw. einer Verstoffwechslung der übrigen betrachteten tRNA-spezifischen Kataboliten abschätzen.

Tatsächlich zeigt Tabelle 17 weitgehende Übereinstimmung des gemessenen Mengenverhältnisses $t^4A : m_2^2G$ im Urin der meisten untersuchten Spezies mit dem für cytoplasmatische tRNA berechneten Verhältnis von $t^4A : m_2^2G$. Falls t^4A tatsächlich grundsätzlich quantitativ ausgeschieden wird, spricht dieser Befund bei den entsprechenden Spezies für quantitative Ausscheidung auch von m_2^2G . Der Mittelwert der Mengenverhältnisse von t^4A zu m_2^2G in den 8 untersuchten Urinen von Primaten und Tupaias (1 : 2.41) stimmt ebenfalls gut mit dem für cytoplasmatische tRNA ermittelten Verhältnis von 1 : 2.24 überein.

Das im Erwachsenen-Urin etwas über dem Erwartungswert liegende beobachtete Mengenverhältnis von $t^4A : m_2^2G$ von 1 : 3.33 könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Nucleoside aus Human-Urin mit der unter 2.1.4. beschriebenen Methode vorgereinigt wurden. Zwar liegen bei dieser Methode die Ausbeuten für die meisten untersuchten Nucleoside aus Human-Urin bei ~100 % (Sander et al, 1985), diejenige für t^4A aber nur bei ~60 % (s. Tab. 6, S. 49). Das könnte bedeuten, daß der Wert für die durchschnittliche t^4A -Konzentration im Erwachsenen-Urin mit $0.43 \pm 0.09 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin (s. Tab. 15) etwas zu niedrig bestimmt wurde. Die von Vold et al mittels Radioimmunoassay bestimmten t^4A -Konzentrationen im Erwachsenen-Urin liegen bei 0.6 bzw. $0.45 \mu\text{mol } t^4A/\text{mmol}$ Kreatinin (Vold et al, 1982 und 1986).

Die nach unten von der Erwartung abweichenden Werte von $m^1G + m^1Gua$ bzw. $m^2G + m^2Gua$ deuten auf mögliche Verstoffwechslung der betreffenden Substanz(en) bei den entsprechenden Spezies.

Tabelle 17:

Auf $t^{\text{A}} = 1$ normierte berechnete Verteilung einiger modifizierter tRNA-Bausteine in cytoplasmatischer tRNA von "Säugern" sowie im Urin verschiedener Spezies gefundene auf $t^{\text{A}} = 1$ normierte Verteilung dieser Bausteine.

	t^{A}	m_2^{G}	$m^{\text{A}}\text{G}+m^{\text{A}}\text{Gua}$	$m^{\text{A}}\text{G}+m^{\text{A}}\text{Gua}$
berechnete durchschnittliche Verteilung in cytoplasmatischer tRNA	1	2.24	2.32	3.42
Verteilung im Urin verschiedener Gattungen:				
Mensch (Erwachsene)	1	3.33	3.11	1.56
Mensch (Frühgeborene)	1	2.44	1.42	1.55
Saguinus	1	2.15	2.89	2.29
Rhesus	1	2.16	1.35	0.34
Javaner	1	2.06	2.82 ^{a)}	2.09
Meerkatze	1	2.23	1.63	0.58
Pavian	1	2.11	2.55	2.80
Tupaia	1	2.78	2.26	3.27
$\bar{x} \pm \text{SD} =$	1	2.41 ± 0.44	2.25 ± 0.70	1.8 ± 1.02
VK =		18.3 %	31.2 %	56.13 %
Ratte	1	0.96	0.52	0.08

^{a)} Meßfehler möglich, da die HPLC-Trennung nicht optimal war.

Besonders auffällig sind die in der letzten Zeile von Tabelle 17 dargestellten Mengenverhältnisse im Ratten-Urin. Hier liegen nicht nur die auf $t^4A = 1$ normierten Anteile von m^4G und m^2G (im Ratten-Urin wurden nur die Nucleoside gefunden, s. Tab. 14) sondern auch das Verhältnis von m_2^2G zu t^4A (im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Urinen) wesentlich niedriger als erwartet. Da aber gerade für t^4A bei Ratten quantitative Ausscheidung beschrieben wurde (Hong et al, 1973), deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß bei der Ratte m^4G und m^2G weitgehend und m_2^2G teilweise verstoffwechselt werden.

3.1.5. Modifizierte RNA-Kataboliten aus dem Abbau von rRNA

Während das modifizierte Nucleosid Ψ bei Säugern in 28S RNA, 18S RNA, 5.8S RNA, tRNA und URNA vorkommt (Khan et al, 1978; Hughes & Maden, 1978; Sprinzl et al, 1985; Busch et al, 1982), wurde das Vorkommen eines Restes m^3U nur in 28S RNA beschrieben (Khan et al, 1978). Da sich der im Urin ausgeschiedene Ψ -Anteil, der wahrscheinlich aus dem Abbau cytoplasmatischer rRNA stammt, ermitteln läßt (Sander et al, 1986a,b; Schöch et al, 1988a), war es interessant zu untersuchen, ob sich die im Urin ausgeschiedene m^3U -Menge zu dem berechneten Ψ -Anteil aus rRNA so verhält, wie es der Stöchiometrie dieser beiden modifizierten Nucleoside in cytoplasmatischer rRNA entspricht. Cytoplasmatische rRNA von Säugern (28S RNA plus 18S RNA plus 5.8S RNA) enthält insgesamt durchschnittlich 95 Ψ -Reste (Hughes & Maden, 1978; Schöch et al, 1988a; Tab 2, s. 8). Da nur ein m^3U -Rest in cytoplasmatischer rRNA (28S RNA) von Säugern vorkommt, beträgt das molare Verhältnis von Ψ : m^3U in cytoplasmatischer rRNA demnach durchschnittlich 95 : 1.

Tabelle 18 zeigt für Ratte und Tupaia durchschnittliche tägliche Ausscheidungswerte von Ψ und m^3U im Urin bzw. die Konzentrationen dieser beiden Nucleoside in jeweils einem Spontan-Urin von Saguinus und Pavian. Die Urinproben waren die gleichen wie in Tabelle 15 (S. 71; nur 11 von 12 Tupaia-Urinen ausgewertet).

Der wahrscheinlich aus dem Abbau von cytoplasmatischer tRNA stammende Ψ -Anteil im Urin vom insgesamt ausgeschiedenen Ψ läßt sich aufgrund

Tabelle 18:

Ausscheidung von Ψ und m^3U im Urin von Ratte, Tupaia, Saguinus und Pavian

	Anzahl der Urine (n)	Ψ	m^3U
Ratte (nmol/24h/Tier)	10 (gemischt)	8851.0	61.10
Tupaia (nmol/24h/Tier) $\pm$ SD	11	2682.41 $\pm$ 733.17	21.10 $\pm$ 6.69
Saguinus (μ mol/L)	1	1144.3	6.60
Pavian (μ mol/L)	1	745.0	3.94

der Kenntnis des durchschnittlichen Vorkommens von Ψ in cytoplasmatischer tRNA und des bekannten Mengenverhältnisses zu weiteren modifizierten Nucleosiden, die ausschließlich in tRNA vorkommen und für die quantitative Ausscheidung in Urin bewiesen oder wahrscheinlich ist (t^6A , m^2G), ermitteln (Schöch et al, 1988a). Das durchschnittliche Verhältnis von Ψ : t^6A in cytoplasmatischer tRNA beträgt 3.02 : 0.224; das Verhältnis von Ψ : m^2G beträgt 3.02 : 0.501 Reste (Tab. 1, S. 5; Schöch et al, 1988a). Durch Multiplikation der im Urin ausgeschiedenen Mengen von t^6A mit 13.48, bzw. der Mengen des ausgeschiedenen m^2G mit 6.03 (in den Fällen, wo eine quantitative Ausscheidung von m^2G wahrscheinlich ist), läßt sich der aus cytoplasmatischer tRNA stammende Ψ -Anteil am insgesamt ausgeschiedenen Ψ abschätzen. Das restliche dürfte weitgehend aus dem Abbau cytoplasmatischer rRNA stammen (Sander et al, 1986a,b; Schöch et al, 1988a), seine Menge kann mit der Menge des ausgeschiedenen, ausschließlich aus rRNA stammenden m^3U in ein Verhältnis gesetzt werden.

Tabelle 19 zeigt das Ergebnis einer solchen Auswertung. Zur Berechnung des Ψ -Anteils aus tRNA wurden die in Tabelle 15 (S. 71) aufgeführten

t^6A - bzw. m_2^2G -Ausscheidungswerte verwendet. Bei der Ratte wurde nur das ausgeschiedene t^6A berücksichtigt, da m_2^2G bei dieser Spezies sehr wahrscheinlich nicht quantitativ im Urin ausgeschieden wird (s. 3.1.4.).

Der Ψ -Anteil im Urin von Ratte und Tupaia, der sich nicht dem Abbau von cytoplasmatischer tRNA zuordnen läßt ($\Delta\Psi$) und der wahrscheinlich aus dem Abbau von cytoplasmatischer rRNA stammt, verhält sich zur Menge des ausgeschiedenen m^3U sehr ähnlich, wie es dem durchschnittlichen molaren Verhältnis von $\Psi : m^3U$ (95 : 1) in cytoplasmatischer rRNA entspricht. Auch der in Urin von Saguinus und Pavian gefundene Quotient $\Delta\Psi : m^3U$ liegt nicht wesentlich höher als das Verhältnis dieser Nucleoside zueinander in cytoplasmatischer rRNA, wobei anzumerken ist, daß bei Saguinus und Pavian jeweils lediglich ein Spontan-Urin zur Verfügung stand.

Tabelle 19:

Quotient aus dem berechneten, wahrscheinlich aus rRNA stammenden Ψ -Anteil im Urin ($\Delta\Psi$) und ausgeschiedenem m^3U

	Ψ_{tRNA}	Ψ_{gesamt} - Ψ_{tRNA} = $\Delta\Psi$	$\frac{\Delta\Psi}{m^3U}$
Ratte (nmol/24h/Tier)			
Ψ_{tRNA} über t^6A -Ausscheidung berechnet	2254.80	6596.20	107.96
Ψ_{tRNA} über m_2^2G -Ausscheidung berechnet	---	---	---
Tupaia (nmol/24h/Tier)			
Ψ_{tRNA} über t^6A -Ausscheidung berechnet	360.72	2321.69	110.03
Ψ_{tRNA} über m_2^2G -Ausscheidung berechnet	448.70	2233.71	105.86
Saguinus ($\mu\text{mol/L}$)			
Ψ_{tRNA} über t^6A -Ausscheidung berechnet	337.81	806.49	122.20
Ψ_{tRNA} über m_2^2G -Ausscheidung berechnet	325.39	818.91	124.08
Pavian ($\mu\text{mol/L}$)			
Ψ_{tRNA} über t^6A -Ausscheidung berechnet	209.75	535.25	135.85
Ψ_{tRNA} über m_2^2G -Ausscheidung berechnet	198.21	546.79	138.78

3.1.6. Modifizierte RNA-Kataboliten aus dem Abbau von tRNA und rRNA

Unter Verwendung von Daten über die Gehalte verschiedener Rattengewebe an rRNA und tRNA (Gunning et al, 1981) läßt sich ein durchschnittlicher Gehalt an tRNA und rRNA für eine idealisierte Säuger-Zelle berechnen (Sander et al, 1986a,b; Schöch et al, 1988a). Dabei ergibt sich ein mittlerer rRNA-Gehalt ($28S\text{ RNA} + 18S\text{ RNA} + 5.8S\text{ RNA} + 5S\text{ RNA} = 1\text{ "Molekül" rRNA}$) von 1×10^6 "Molekülen" pro Zelle und ein mittlerer tRNA-Gehalt von 23.5×10^6 Molekülen pro Zelle, also ein Mengenverhältnis von tRNA : rRNA von 23.5 : 1 (Schöch et al, 1988a).

Nach Zuordnung der bekannten durchschnittlichen Anzahl an Resten modifizierter Bausteine pro rRNA- bzw. tRNA-Molekül können Angaben über die durchschnittliche Anzahl dieser modifizierten Bausteine in GesamtrRNA und Gesamt-tRNA in einer idealisierten Säuger-Zelle gemacht werden. Tabelle 20 zeigt die so berechnete Verteilung von Ψ , m_2^2G und t^4A auf rRNA, tRNA und zusätzlich URNA, ferner in der rechten Spalte den errechneten Gesamtgehalt einer idealisierten Säuger-Zelle an diesen Bausteinen.

Für U1- bis U6-RNA wurde eine durchschnittliche Anzahl von 0.8×10^6 Molekülen für die idealisierte Zelle berechnet (Sander et al, 1986a; Schöch et al, 1988a). Diese setzt sich wie folgt zusammen (Moleküle/Zelle): 0.32×10^6 U1, 0.12×10^6 U2, 0.013×10^6 U3, 0.16×10^6 U4, 0.1×10^6 U5 und 0.1×10^6 U6 (Gunning et al, 1981; Busch et al, 1982; Sander et al, 1986a). Die Ψ -Gehalte der einzelnen URNAs wurden anhand der sequenzierten URNAs aus Busch et al (1982) ermittelt.

Tabelle 20:

Gehalt einiger modifizierter Nucleoside in RNA einer idealisierten Säuger-Zelle (nach Schöch et al, 1988a).

Nucleosid	Anzahl der Reste pro Zelle $\times 10^6$ in:			
	tRNA	rRNA	URNA	Σ
Ψ	71.0	95.0	3.3	169.30
m_2^2G	11.77	--	--	11.77
t^4A	5.26	--	--	5.26

Für tRNA und rRNA wurden jeweils ähnliche Halbwertszeiten in verschiedenen Geweben der Ratte beschrieben (in den Fällen, bei denen für die Halbwertszeit von tRNA zwei Werte angegeben sind, wurde der erste bei 12 Monate alten Ratten, der zweite bei 24 Monate alten Ratten bestimmt): in Leber 3 - 5 d (Hanoune & Agarwal, 1970; Warner, 1974); in Leber 5.89 d für rRNA, 4.59 d bzw. 5.34 d für tRNA; in Niere 6.53 d für rRNA, 4.99 d bzw. 9.51 d für tRNA; in Lunge 8.98 d für rRNA, 8.75 d für tRNA; in Milz 8.61 d für rRNA, 6.46 d bzw. 8.29 d für tRNA; in Darmschleimhaut 8.13 d für rRNA, 11.4 d für tRNA (Mays, 1983).

URNAs gelten als stabil (Busch et al, 1982). Die in der Gehirnrinde von Ratten gemessenen Halbwertszeiten von U1-, U2-, und U5-RNA (17 d, 22 d, 12 d) ähneln den gemessenen Halbwertszeiten von 28S RNA, 18S RNA, 5.8S RNA, 5S RNA und tRNA (15 d, 20 d, 14 d, 20 d und 12 d; Gunning et al, 1981).

Bei Annahme jeweils ähnlicher Halbwertszeiten für tRNA und rRNA in den verschiedenen Geweben eines Gesamtorganismus und eines durchschnittlichen Mengenverhältnisses von rRNA : tRNA von 1 : 23.5 (das für die idealisierte Zelle berechnet wurde; s.o.) sollten m_2^2G bzw. t^*A im Gesamtorganismus durchschnittlich in eben den Proportionen zu Ψ aus ihren Herkunftsmolekülen freigesetzt werden, die zwischen der in der rechten Spalte von Tabelle 20 dargestellten Gesamt-Verteilung von t^*A bzw. m_2^2G zu Ψ in der idealisierten Säuger-Zelle bestehen. Der durchschnittliche Ψ -Anteil aus URNA sollte dabei nicht sonderlich ins Gewicht fallen, vorausgesetzt, die für URNA angenommene Konzentration von $\sim 0.8 \times 10^6$ Molekülen/Zelle sowie Halbwertszeiten in der Größenordnung derjenigen von tRNA und rRNA gelten weitgehend für den Gesamtorganismus.

Tabelle 21 zeigt die auf $\Psi = 100$ normierte Verteilung der Anzahl der Reste m_2^2G bzw. t^*A in einer idealisierten Säuger-Zelle (vgl. rechte Spalte von Tabelle 20) und die auf $\Psi = 100$ normierten gemessenen Mengen bzw. Konzentrationen von t^*A bzw. m_2^2G in den Urinen verschiedener Säuger (Tab. 15 u. 18, S. 71 u. 77). Die Meßwerte für Ψ in den Urinen der nicht bereits in Tabelle 18 gezeigten Säuger, betrugen: Mensch (Erwachsene) $25.3 \pm 3.1 \mu\text{mol } \Psi/\text{mmol Kreatinin}$ ($n = 32$); Mensch (Frühgeborene) $164.0 \pm 32 \mu\text{mol } \Psi/\text{mmol Kreatinin}$ ($n = 38$); Rhesus $185.8 \mu\text{mol } \Psi/\text{l}$; Javaner $157.9 \mu\text{mol } \Psi/\text{l}$; Meerkatze $483.3 \mu\text{mol } \Psi/\text{l}$.

Tabelle 21:

Auf $\Psi = 100$ normierte Verteilung von m_2^2G und t^*A in RNA einer idealisierten Säuger-Zelle und auf $\Psi = 100$ normierte Verteilung dieser Nucleoside im Urin verschiedener Säuger.

	Verteilung der Nucleoside		
	Ψ	m_2^2G	t^*A
idealisierte Säuger-Zelle	100	6.95	3.11
Urin:			
Mensch (Erwachsene)	100	5.65	1.70
Mensch (Frühgeborene)	100	5.75	2.36
Saguinus	100	4.72	2.19
Rhesus	100	4.28	1.98
Javaner	100	3.91	1.89
Meerkatze	100	5.87	2.63
Pavian	100	4.41	2.09
$\bar{x}$ (Primaten)	100	4.94	2.12
$\pm$ SD		± 0.80	± 0.31
VK %		16.22	14.57
% Abweichung des $\bar{x}$ der Verhältnisse von t^*A bzw. m_2^2G zu Ψ von der ent- sprechenden Verteilung in einer idealisierten Zelle	-	-28.9 %	-31.8 %
Urin:			
Ratte	100	1.81	1.89
Tupaia	100	2.77	1.00

Die auf $\Psi = 100$ normierte Ausscheidung von t^*A (Tab. 21) in den untersuchten Primaten-Urinen liegt im Mittel nur um 32 % niedriger als die berechnete Verteilung von t^*A zu Ψ in der idealisierten Säuger-Zelle. Auch die Unterschiede der entsprechenden t^*A -Werte zwischen den einzelnen Primaten-Urinen sind relativ gering (VK = 14.57 %). Der auf $\Psi = 100$ normierte t^*A -Wert im Ratten-Urin liegt ebenfalls im Bereich des für Primaten-Urin bestimmten Mittelwertes.

Insgesamt gesehen stimmen die in den Urinen von Primaten und Ratten gemessenen Mengenverhältnisse von Ψ zu t^*A weitgehend mit dem für eine idealisierte Säuger-Zelle berechneten Verhältnis von Ψ zu t^*A überein. Im Gegensatz dazu beträgt der im Tupaia-Urin auf $\Psi = 100$ normierte t^*A -Wert allerdings nur 32 % des entsprechenden t^*A -Wertes der idealisierten Zelle.

Die Mengenverhältnisse von m_2^2G zu Ψ in den untersuchten Primaten-Urinen liegen im Mittel ebenfalls um ~30 % niedriger als für die idealisierte Zelle berechnet (Tab. 21). Auch die Schwankungen der Verhältnisse zwischen den einzelnen Primaten-Urinen (VK = 16.22 %) bewegen sich in dem Bereich, der für die Schwankungen der Verhältnisse von t^*A zu Ψ gefunden wurde.

Das Verhältnis $m_2^2G : \Psi$ im Ratten-Urin liegt dagegen wesentlich niedriger als für die idealisierte Zelle berechnet (-74 %). m_2^2G wird allerdings bei der Ratte vermutlich nicht quantitativ im Urin ausgeschieden (s. 3.1.4.).

Auch das in Tupaia-Urin gefundene Mengenverhältnis $m_2^2G : \Psi$ zeigt ebenso wie das Verhältnis $t^*A : \Psi$ bei dieser Spezies (s. o.) eine stärkere Abweichung von dem entsprechenden Verhältnis in der idealisierten Zelle als in allen untersuchten Primaten-Urinen.

3.1.7. Herkunft von m^7Gua im Urin

Das modifizierte Nucleosid m^7G kommt bei Säugern in tRNA, rRNA und mRNA vor. In cytoplasmatischer mRNA ist es Bestandteil verschiedener Cap-Strukturen, wobei sich pro mRNA-Molekül ein m^7G -Rest in der Cap-

Struktur befindet (Abb. 1, S. 2; Moss, 1984). Für cytoplasmatische tRNA ergibt sich ein durchschnittlicher m⁷G-Gehalt von 0.438 Resten pro Molekül (Tab. 1, S. 5; Sander et al, 1986a; Schöch et al, 1988a); cytoplasmatische rRNA enthält einen m⁷G-Rest pro 185 RNA (Tab. 2, S. 8; Khan et al, 1978).

In Human-Urin wurde kein m⁷G gefunden (Mrochek et al, 1974). Dagegen wird die modifizierte Nucleobase m⁷Gua im Urin ausgeschieden. Außerdem wurde das Hydroxylierungsprodukt OH⁶m⁷Gua (8-Hydroxy-7-methylguanin) in Human-Urin von Litwack & Weissmann (1966) und Skupp & Ayvazian (1969) beschrieben; dabei betrug das molare Verhältnis von m⁷Gua : OH⁶m⁷Gua durchschnittlich 60 : 40. Beide Arbeitsgruppen beschrieben die Entstehung von OH⁶m⁷Gua aus m⁷Gua. Bei der Ratte wird m⁷Gua nach intraperitonealer Injektion zu ~95 % im Urin ausgeschieden (Craddock et al, 1968). Ein geringer Teil von injiziertem m⁷Gua wird bei der Ratte und möglicherweise auch beim Menschen demethyliert (Craddock et al, 1968; Skupp & Ayvazian, 1969). In Ratten-Urin wurde OH⁶m⁷Gua nicht gefunden (Mandel et al, 1966).

Sander et al (1986a,b) konnten aufgrund von Berechnungen zeigen, daß der größte Teil des in Human-Urin ausgeschiedenen m⁷Gua (~75 %, das mutmaßliche Hydroxylierungsprodukt OH⁶m⁷Gua wurde nicht gemessen) wahrscheinlich nicht aus dem Abbau von rRNA und tRNA stammt, sondern aus dem Abbau von mRNA.

Derartige Berechnungen sind möglich, da sich (nach vorheriger Berechnung des tRNA-Umsatzes auf der Basis der Ausscheidung von t⁶A bzw. m₂²G) aufgrund der bekannten durchschnittlichen Verteilung von m⁷G zu t⁶A bzw. zu m₂²G in cytoplasmatischer tRNA (Tab. 1, S. 5) der m⁷Gua Anteil im Urin, der wahrscheinlich aus dem Umsatz von tRNA stammt, ermitteln läßt (Sander et al, 1986a; Schöch et al, 1988a). Das durchschnittliche berechnete Mengenverhältnis von m⁷G : t⁶A in cytoplasmatischer tRNA beträgt 0.438 : 0.224, das von m⁷G : m₂²G beträgt 0.438 : 0.501. Durch Multiplikation des im Urin ausgeschiedenen t⁶A mit 1.96 bzw. des ausgeschiedenen m₂²G mit 0.874 läßt sich so der durchschnittliche m⁷Gua-Anteil im Urin, der dem Abbau von tRNA zugeordnet werden kann, bestimmen. Eine Voraussetzung für ein derartiges Vorgehen ist allerdings, daß die Ausscheidung von t⁶A bzw. m₂²G im Urin quantitativ ist, was für

t^4A bei Ratte und Mensch beschrieben wurde (Hong et al, 1973) und beim Menschen und einer Reihe von weiteren Säugern auch für m^2G wahrscheinlich ist (s. 3.1.4. und 3.1.8.).

Weiterhin kann aufgrund des bekannten durchschnittlichen molaren Verhältnisses von m^7G (1 Rest) zu Ψ (95 Reste) in rRNA (Khan et al, 1978) der m^7Gua -Anteil im Urin, der sich dem Abbau von rRNA zuordnen läßt, bestimmt werden. Dieses Vorgehen ist dadurch möglich, daß sich wiederum der Ψ -Anteil im Urin, der wahrscheinlich aus dem Abbau der rRNA stammt, berechnen läßt, indem der aus dem tRNA-Abbau stammende Ψ -Anteil von dem insgesamt ausgeschiedenen Ψ abgezogen wird (s. 3.1.5.). Wird dieser für den Abbau der rRNA berechnete Ψ -Anteil im Urin durch 95 geteilt, so erhält man den m^7Gua -Anteil im Urin, der sich dem Abbau von rRNA zuordnen läßt. Das restliche, von der Gesamtausscheidung nach Abzug der m^7Gua -Anteile aus dem tRNA- und rRNA-Abbau übrig bleibende m^7Gua stammt wahrscheinlich aus dem Abbau von mRNA.

Auf diese Weise läßt sich allerdings nur ein m^7Gua -Mindestanteil im Urin bestimmen, der wahrscheinlich aus dem mRNA-Umsatz stammt, da (außer bei der Ratte) nicht bekannt ist, inwieweit bei verschiedenen Spezies zusätzlich das mögliche Hydroxylierungsprodukt OH^6m^7Gua ausgeschieden wird, und da eine teilweise Demethylierung von m^7Gua bzw. eine sonstige Verstoffwechselung von m^7Gua nicht ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 22 (S. 85) zeigt die m^7Gua -Ausscheidungswerte, die im Urin verschiedener Säuger bestimmt wurden, sowie die über die jeweilige t^4A - und Ψ -Ausscheidung (I) bzw. über die jeweilige m^2G - und Ψ -Ausscheidung (II) berechneten m^7Gua -Anteile im Urin, die sich dem Abbau von tRNA, rRNA und mRNA zuordnen lassen (zur Ausscheidung von Ψ , t^4A und m^2G vgl. Tab. 15 u. 18, S. 71 u. 77 sowie Ψ -Werte auf Seite 80 unten; die untersuchten Urine und die verwendeten Einheiten bei den m^7Gua -Bestimmungen sind mit den dort genannten identisch).

Aus Tabelle 22 wird ersichtlich, daß sich in allen untersuchten Urinen ein m^7Gua -Anteil ermitteln läßt, der sich nicht dem Abbau von rRNA und tRNA zuordnen läßt und der wahrscheinlich aus dem Abbau von mRNA stammt. Die Ergebnisse sind weitgehend unabhängig vom Berechnungsmodus (I bzw. II). Für Ratten-Urin wurden wegen der offensichtlich nicht

Tabelle 22:

m⁷Gua-Ausscheidung im Urin verschiedener Spezies sowie mittels der t⁶A- bzw. Ψ-Ausscheidung (I) oder der m⁷G- bzw. Ψ-Ausscheidung (II) berechnete m⁷Gua-Anteile aus dem Abbau von tRNA, rRNA und mRNA

	m ⁷ Gua- Ausscheidung im Urin	berechneter m ⁷ Gua- Anteil aus tRNA		berechneter m ⁷ Gua- Anteil aus rRNA		berechneter m ⁷ Gua- Anteil aus mRNA	
		I	II	I	II	I	II
Mensch, Erwachsener (μmol/mmol Kreatinin)	4.8 ± 0.89	0.84	1.24	0.21	0.18	3.75	3.38
Mensch, Frühgeborener (μmol/mmol Kreatinin)	39.1 ± 9.0	7.59	8.24	1.18	1.13	30.33	29.73
Saguinus (μmol/L)	133.6	49.12	47.18	8.48	8.62	75.99	77.80
Rhesus (μmol/L)	15.5	7.21	6.95	1.43	1.45	6.86	7.10
Javaner (μmol/L)	14.4	5.86	5.39	1.23	1.27	7.31	7.74
Meerkatze (μmol/L)	57.6	24.91	24.78	3.28	3.28	29.41	29.54
Pavian (μmol/L)	69.0	30.50	28.74	5.63	5.76	32.87	34.50
Tupaia (nmol/24h/Tier)	337.5 ± 85.9	51.86	65.05	24.44	23.51	261.20	248.94
Ratte (nmol/24h/Tier)	1454.3	327.85	-	69.43	-	1057.06	-

Tabelle 23:

Prozentuale Verteilung der berechneten m⁷Gua-Anteile aus dem Abbau von tRNA, rRNA und mRNA im Vergleich zur Gesamtausscheidung von m⁷Gua (= 100 % gesetzt). (I) Berechnung über t⁶A- bzw. Ψ -Ausscheidung, (II) Berechnung über m²G- bzw. Ψ -Ausscheidung

	m ⁷ Gua Gesamt- ausscheidung im Urin (%)	berechneter m ⁷ Gua- Anteil aus tRNA (%)		berechneter m ⁷ Gua- Anteil aus rRNA (%)		berechneter m ⁷ Gua- Anteil aus mRNA (%)	
		I	II	I	II	I	II
Mensch,	100	17.50	25.83	4.38	3.75	78.12	70.42
Erwachsener							
Mensch,	100	19.41	21.07	3.02	2.89	77.57	76.04
Frühgeborener							
Saguinus	100	36.77	35.31	6.35	6.45	56.88	58.23
Rhesus	100	46.52	44.84	9.23	9.35	44.26	45.81
Javaner	100	40.69	37.43	8.54	8.81	50.76	53.75
Meerkatze	100	43.25	43.02	5.69	5.69	51.06	51.28
Pavian	100	44.20	41.65	8.16	8.35	47.64	50.00
Tupaia	100	15.37	19.27	7.24	6.97	77.39	73.76
Ratte	100	22.54	-	4.77	-	72.68	-

quantitativen Ausscheidung von m_2^2G (s. 3.1.4.) nur die t^*A - und Ψ -Ausscheidungswerte zur Berechnung herangezogen.

Die m^7Gua -Anteile in den verschiedenen Urinen, die nach Abzug der jeweils aus dem $tRNA$ - und $rRNA$ -Abbau stammenden Anteile übrigbleiben, betragen $\sim 45\%$ bis $\sim 75\%$ der jeweiligen m^7Gua -Gesamtausscheidung (Tab. 23, S. 86).

3.1.8. Ausscheidung modifizierter Nucleoside bei Tupaia nach i.p. Gabe

Die Frage nach einer quantitativen Ausscheidung modifizierter RNA -Kataboliten wurde durch Injektionsversuche bei Tupaia als Tiermodell experimentell überprüft.

Dabei war von besonderem Interesse, ob das bei Säugern für cytoplasmatische $tRNA$ spezifische Nucleosid m_2^2G verstoffwechselt wird. Aufgrund eines Vergleichs zwischen dem berechneten Vorkommen von m_2^2G und Ψ in einer idealisierten Säuger-Zelle (vgl. 3.1.6.) und der Ausscheidung dieser beiden modifizierten RNA -Kataboliten in Humanurin postulierten Sander et al (1984; 1986a,b) quantitative Ausscheidung von m_2^2G beim Menschen. m_2^2G wird darüber hinaus in Primaten- und Tupaia-Urin durchschnittlich in eben dem Mengenverhältnis zu t^*A gefunden, das für das relative Vorkommen dieser beiden Nucleoside in $tRNA$ von Säugern berechnet wurde (3.1.4.).

Weiterhin war von großem Interesse, ob das bei Säugern für cytoplasmatische $rRNA$ spezifische Nucleosid m^*U quantitativ in Urin ausgeschieden wird. In den Urinproben der untersuchten Säuger, in denen m^*U gemessen werden konnte, weicht nämlich das Mengenverhältnis von m^*U zu dem Ψ -Anteil im Urin, der wahrscheinlich aus dem Abbau von $rRNA$ stammt, nicht wesentlich von dem Verhältnis ab, das zwischen m^*U und Ψ in $rRNA$ vorliegt (vgl. 3.1.5.).

Als Vorversuch wurde Tupaia zuerst das Nucleosid Ψ injiziert. Damit sollte die von Dugaiczky & Eiler (1966) und Weissman et al (1962) beschriebene Nichtverstoffwechselung von Ψ bei Mensch und Ratte ergän-

zend bei Tupaia untersucht werden. Zudem sollte mit diesem Vorversuch geklärt werden, ob Tupaia als Versuchstiere prinzipiell eignen, da bei diesen Tieren, die nicht in Stoffwechsel-Käfigen gehalten werden können, Urin-Verluste nicht auszuschließen waren.

Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der Ψ -Injektion bei Tupaia A.

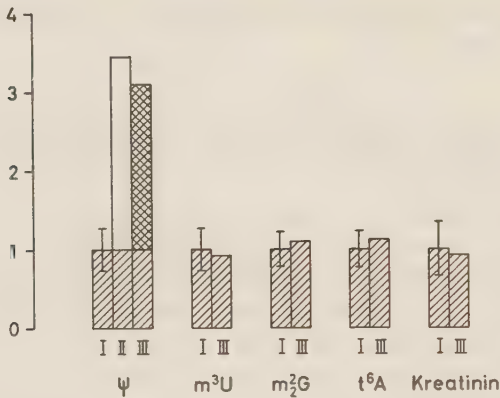


Abbildung 23:

Injektion von Ψ bei Tupaia A. Die mittlere Ausscheidung der gemessenen Substanzen in nmol/d $\pm$ SD betrug: Ψ 2954.3 $\pm$ 835.9; m^3U 18.7 $\pm$ 5.1; m^2G 95.7 $\pm$ 22.3; t^6A 35.3 $\pm$ 8.6; Kreatinin 36880 $\pm$ 12300. Weitere Erklärungen s. Text.

Die mit I bezeichneten Säulen zeigen die über 3 Tage gemittelten Ausscheidungswerte pro Tag von Ψ , m^3U , m^2G , t^6A und Kreatinin (1. Tag vor der Injektion, 2. und 3. Tag nach der Injektion), die gleich 1 gesetzt wurden, sowie die jeweilige relative Standardabweichung. In der mit II bezeichneten Säule ist der Mittelwert der Ausscheidung von Ψ schraffiert dargestellt, darüber in weiß die injizierte Ψ -Menge (dargestellt als Vielfaches der mittleren Tagesausscheidung). Dieser obere Teil der Säule II stellt gleichzeitig den Erwartungswert bei 100 % Wiederfindung dar. Die mit III bezeichneten Säulen geben die jeweils

gemessene Ausscheidung der Nucleoside sowie von Kreatinin innerhalb von 24 h nach Injektion wieder (ebenfalls in Vielfachen der mittleren Tagesausscheidung). Im Falle von Ψ ist in Säule III der Mittelwert der 24 h-Ausscheidung (aus I) im unteren Teil (schraffiert) eingezeichnet, darüber (kariert) das zusätzlich innerhalb von 24 h nach der Injektion ausgeschiedene Ψ . Von dem injizierten Ψ wurden bei Tupaia A nach der Injektion bei Zugrundelegung des Mittelwertes für die Ausscheidung von Ψ 86.4 % wiedergefunden. Bei den restlichen im Urin bestimmten modifizierten Nucleosiden und bei Kreatinin wurden innerhalb von 24 h nach der Injektion keine wesentlichen Abweichungen der ausgeschiedenen Mengen von der gemessenen mittleren Ausscheidung beobachtet, so daß am Tag nach der Injektion keine größeren Verluste bei der Urinsammlung aufgetreten sein dürften.

In Abbildung 24 sind entsprechende Ergebnisse bei einem weiteren Tier (Tupaia B) dargestellt. 24 Stunden nach der Injektion fanden sich bei Zugrundelegung des Mittelwertes der Ausscheidung von Ψ 78.3 % der injizierten Ψ -Menge im Urin wieder.

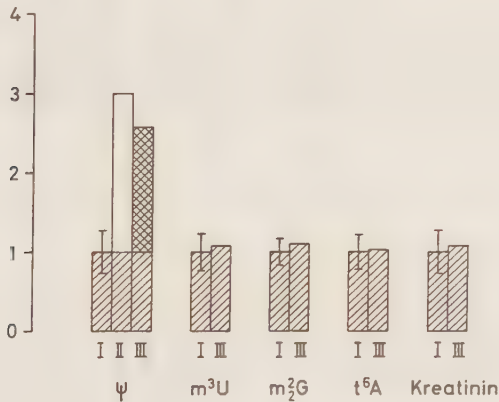


Abbildung 24:

Injektion von Ψ bei Tupaia B. Die mittlere Ausscheidung der gemessenen Substanzen in nmol/d $\pm$ SD betrug: Ψ 3595 $\pm$ 943.9; m^3U 23.3 $\pm$ 5.4; m_2G 113.9 $\pm$ 21.2; t^6A 41.8 $\pm$ 9.4; Kreatinin 44940 $\pm$ 12500. Weitere Erklärungen s. Text.

Bei zwei weiteren Injektionsversuchen mit Ψ (Tupaia C und D) wurden innerhalb von 24 h nach der Injektion beim ersten Tier 70 %, beim zweiten 37.9 % des injizierten Ψ wiedergefunden (mittlere Ausscheidung von Ψ 2975.1 ± 239.0 nmol/d bei Tupaia C bzw. 3523.4 ± 506 nmol/d bei Tupaia D). Beim letztgenannten Tier wurden im Urin am Tag nach der Injektion aber nur 41.9 % des durchschnittlich gemessenen Kreatinins gefunden, so daß bei diesem Tier bei der Urin-Sammlung größere Verluste aufgetreten sind.

Insgesamt zeigen diese Injektionsversuche, daß Ψ bei Tupaia im Durchschnitt zu 80 % im Urin wiedergefunden wird, also nach intraperitonealer Injektion annähernd quantitativ im Urin ausgeschieden wird. Mögliche Ursachen für die aufgetretenen Verluste von ~ 20 % könnten sein: ständige geringe Verluste bei den Urin-Sammlungen; eine teilweise Stoffwechselung von injiziertem Ψ ; Ausscheidung eines Teils des injizierten Ψ über andere Wege als über den Urin; Ausscheidung der restlichen ~ 20 % des injizierten Ψ über die folgenden Tage verteilt (bei den durchschnittlichen Schwankungen der gemessenen Ausscheidung von Ψ von ~ 25 % wäre dies nicht zu sehen).

Die für Mensch und Ratte beschriebene quantitative Ausscheidung von Ψ in Urin (Weissman et al, 1962; Dugaiczky & Eiler, 1966) darf aufgrund der hier dargestellten Befunde wohl auch für Tupaia angenommen werden.

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse eines Injektionsversuchs von m^3U , m^2G , m^1G und m^2G bei Tupaia B dargestellt. Diese vier modifizierten Nucleoside wurden in einem Gemisch gleichzeitig injiziert (s. 2.1.3). Die Darstellung der Ergebnisse mittels Säulen I-III entspricht dem oben (Abb. 23) für Ψ erläuterten Schema. Die Mittelwerte wurden aus der Ausscheidung von insgesamt 3 Tagen (1. und 2. Tag vor der Injektion und 2. Tag nach der Injektion) berechnet.

Die als Säulen "III" dargestellten Ergebnisse zeigen für m^3U eine Wiederfindung von 107.8 % innerhalb 24 h. Die entsprechenden Werte für m^2G , m^1G und m^2G (im Urin als $m^2G + m^2Gua$ gemessen) betrugen 98.3 %, 75.1 % bzw. 65.7 %.

Bei der bisherigen Darstellung der Ergebnisse wurde davon ausgegangen, daß die jeweilige "Basisausscheidung" von m^0U , m^2G , m^1G und $m^2G + m^2Gua$ im Urin innerhalb von 24 h nach der Injektion der mittleren Ausscheidung der jeweiligen Nucleoside bzw. Nucleobasen pro Tag entsprach. Während bei den dargestellten Injektionsversuchen mit Ψ (s. Abb. 23 u. 24) die ausgeschiedenen Mengen der im Urin gemessenen, nicht injizierten Verbindungen innerhalb von 24 h nach der Injektion tatsächlich keine erhebliche Abweichung von der mittleren Tagesausscheidung aufwiesen, zeigte sich bei dem in Abbildung 25 dargestellten Injektions-

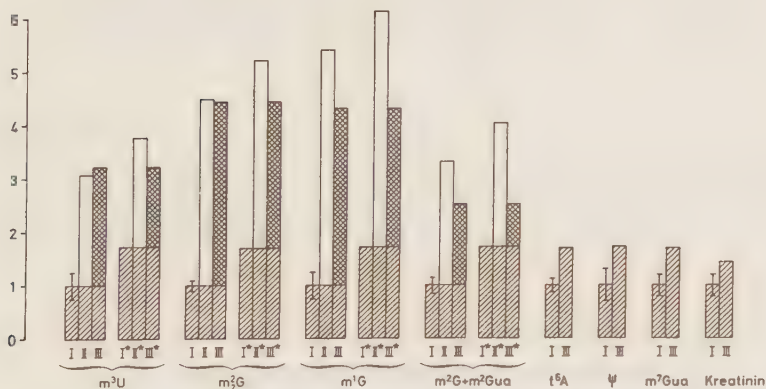


Abbildung 25:

Injektion von m^0U , m^2G , m^1G und m^2G bei Tupaia B. Die mittlere Ausscheidung der gemessenen Nucleoside bzw. Nucleobasen sowie die von Kreatinin in nmol/d $\pm$ SD betrug: Ψ 3424.5 ± 1059.8 ; m^0U 29.1 ± 7.3 ; m^2G 101.4 ± 9.4 ; m^1G 76.1 ± 18.6 ; $m^2G + m^2Gua$ 120.0 ± 16.8 ; t^0A 36.7 ± 4.4 ; m^2Gua 439.4 ± 91.1 ; Kreatinin 54630 ± 11530 . Weitere Erklärungen s. Text.

versuch, daß innerhalb von 24 h nach der Injektion die nicht injizierten modifizierten RNA-Kataboliten t^0A , Ψ und m^2Gua um $\sim 72\%$ sowie Kreatinin um $\sim 43\%$ höhere Ausscheidungswerte aufwiesen, als es der gemessenen mittleren Ausscheidung entsprach. Eine Erklärung für diesen

Befund könnte darin bestehen, daß die Injektion zu einer nur an den nicht injizierten Substanzen erkennbaren Steigerung der Basisausscheidung, z.B. als Stressfolge, führen kann.

Unter dieser Annahme wurde daher ein zweiter Auswertungsmodus (in Abb. 25 durch * gekennzeichnet) angewendet. Ausgehend davon, daß die "Basisausscheidungen" von m^3U , m_2^2G , m^1G und $m^2G + m^2Gua$ innerhalb von 24 h nach der Injektion ebenfalls um entsprechende Mengen, wie sie bei den nicht injizierten RNA-Kataboliten gemessen wurden, erhöht waren, wurden die jeweiligen Mittelwerte der gemessenen Ausscheidungen von m^3U , m_2^2G , m^1G und $m^2G + m^2Gua$ um 72 % erhöht, dargestellt in den mit I* bezeichneten Säulen. Die Darstellung der so abgeleiteten Ergebnisse mittels der Säulen II* und III* entspricht im übrigen dem Schema der Säulen II und III.

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, daß selbst bei Berücksichtigung einer fallweisen Steigerung der endogenen Ausscheidung von modifizierten RNA-Kataboliten nach Injektion die Wiederfindung von m^3U noch 73.1 % und diejenige von m_2^2G noch 77.8 % der injizierten Menge betrug, während die Wiederfindung von m^1G auf 58.9 %, die von m^2G (gemessen als $m^2G + m^2Gua$) auf 34.7 % zurückging. Im Falle von m^2Gua ist es fraglich, ob die im Injektionsgemisch vorhandene Menge quantitativ injiziert wurde, da m^2Gua schon beim Ansetzen des Injektionsgemisches schwer in Lösung zu bringen war, und da das Gemisch eingefroren verschickt und erst kurz vor der Injektion aufgetaut wurde.

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse einer Nucleosidinjektion bei einem weiteren Tier (Tupaia D) dargestellt. Die Wiederfindungsraten betrugen ohne Korrektur 95.2 % m^3U , 92.2 % m_2^2G , 60.1 % m^1G und 46.8 % $m^2G + m^2Gua$. Mit Korrektur für erhöhte Basisausscheidung ($\psi + 45.4$ %, $t^4A + 74.2$ %, $m^7Gua + 50.6$ %, Kreatinin + 44,7 %; für die Korrektur einheitlich + 74.2 % angenommen) ergaben sich folgende Wiederfindungsraten: m^3U 70 %, m_2^2G 80 %, m^1G 49 %, $m^2G + m^2Gua$ 22.3 %. Die Ergebnisse dieser Nucleosidinjektion bei Tupaia D bestätigen den bei Tupaia B erhaltenen Befund, daß intraperitoneal injiziertes m^3U bzw. m_2^2G innerhalb von 24 h nach der Injektion größtenteils in Urin ausgeschieden wird.

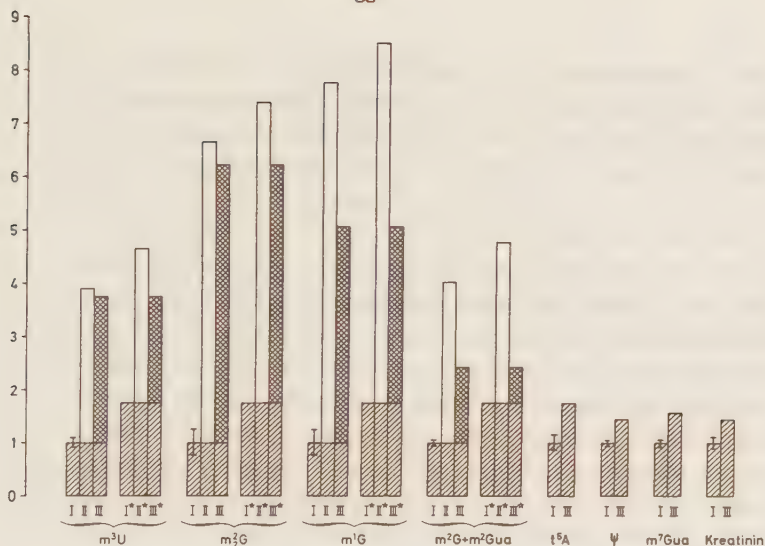


Abbildung 26:

Injektion von m^3U , m^2G , m^1G und m^2G bei Tupaia D. Die mittlere Ausscheidung der gemessenen Nucleoside bzw. Nucleobasen sowie die von Kreatinin in nmol/d $\pm$ SD betrug: Ψ 2479.3 ± 139.4 ; m^3U 20.8 ± 2.2 ; m^2G 63.0 ± 15.5 ; m^1G 49.7 ± 11.6 ; $m^2G + m^2Gua$ 92.2 ± 4.4 ; t^4A 22.4 ± 3.4 ; m^7Gua 285.7 ± 19.1 und Kreatinin 32820 ± 3410 . Weitere Erklärungen s. Text.

Bei zwei weiteren Tupaia (A und C), denen das Nucleosidgemisch injiziert wurde, lag die Wiederfindung der Nucleoside einschließlich m^2Gua im Urin innerhalb von 24 h allerdings wesentlich niedriger als bei Tupaia B und D. So konnten von den injizierten Nucleosiden bei Tupaia A nur 42.5 % m^3U , 39.0 % m^2G , 25.3 % m^1G und 12.2 % $m^2G + m^2Gua$ im Urin wiedergefunden werden. Bei diesem Tier waren allerdings auch die im Urin gemessenen Mengen nicht injizierter Verbindungen innerhalb von 24 h nach der Injektion im Vergleich zur mittleren Ausscheidung wie folgt erniedrigt: Ψ -19.5 %, t^4A -9.4 %, m^7Gua -48.7 % und Kreatinin -31.0 %. Bei Tupaia C betrugen die Wiederfindungsraten 27.0 % m^3U , 20.4 % m^2G , 15.2 % m^1G und 12.8 % $m^2G + m^2Gua$. Die ausgeschiedenen Mengen nicht injizierter Nucleoside waren in diesem Fall innerhalb 24 h

nach der Injektion gegenüber den durchschnittlich ausgeschiedenen Mengen nicht erniedrigt. Die niedrigen Wiederfindungsraten injizierter Nucleoside bei diesen beiden Tupaia sind wahrscheinlich auf Urinverluste bei der Sammlung zurückzuführen (ausführlich diskutiert unter 4.5.).

Wegen der Uneinheitlichkeit der Ergebnisse wurden die Nucleoside den gleichen Tieren ein zweites Mal injiziert. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse der 2. Nucleosidinjektion bei Tupaia D. Die Darstellung der Ergebnisse entspricht derjenigen bei der 1. Nucleosidinjektion (Abb. 25 u. 26), mit dem Unterschied, daß keine Korrektur für die "Basisausscheidung" der injizierten Verbindungen durch einen zweiten Auswertungsmodus vorgenommen wurde, weil für die im Urin gemessenen nicht injizierten Verbindungen (t^6A , Ψ und Kreatinin) innerhalb 24 h nach der Injektion keine wesentlich erhöhte Ausscheidung im Vergleich zur gemessenen mittleren Ausscheidung zu beobachten war. Bei diesem 2. Injektionsversuch wurden m^7Gua , m^2G und m^2Gua nicht bestimmt.

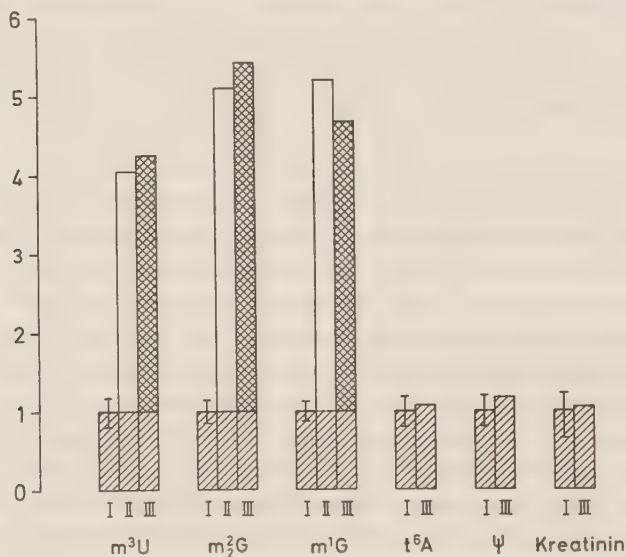


Abbildung 27:

Injektion von m^3U , m^2G , m^1G und m^2Gua bei Tupaia D. Die mittlere Ausscheidung der gemessenen Nucleoside sowie die von Kreatinin in nmol/d $\pm$ SD betrug: Ψ 3449.7 $\pm$ 681.0; m^3U 22.8 $\pm$ 4.3; m^2G 88.8 $\pm$ 13.3; m^1G 88.5 $\pm$ 10.4; t^6A 34.0 $\pm$ 6.5 und Kreatinin 50560 $\pm$ 11010. Weitere Erklärungen s. Text.

Für injiziertes m^3U und m_2^2G wurde auch in diesem Versuch bei Tupaia D eine hohe Wiederfindung im Urin ermittelt (m^3U 107 %, m_2^2G 108.3 % der injizierten Menge). Wie schon bei Tupaia B und Tupaia D im 1. Injektionsversuch, lag auch diesmal die Wiederfindung von m^1G niedriger als diejenige von m^3U bzw. m_2^2G (87.5 % der injizierten Menge).

Bei 3 weiteren Tupaia, denen die Nucleoside zum 2. Mal injiziert wurden, lagen die Wiederfindungsraten niedriger als bei Tupaia D. So betrugen sie bei Tupaia B: 62.5 % für m^3U , 53.5 % für m_2^2G und 39.8 % für m^1G ; bei Tupaia A: 58,8 % für m^3U , 64.3 % für m_2^2G und 37.0 % für m^1G . Bei Tupaia C, bei dem auch im 1. Injektionsversuch die niedrigsten Wiederfindungsraten gemessen wurden, lagen diesmal die innerhalb 24 h ausgeschiedenen Mengen von m^3U , m_2^2G und m^1G sogar niedriger (~ -14 %), als es der gemessenen mittleren Ausscheidung dieses Tieres entsprach.

Die niedrigen Wiederfindungsraten sind auch hier sehr wahrscheinlich auf Verluste bei der Urinsammlung zurückzuführen (ausführlich diskutiert unter 4.5.). Nähme man als Ursache stattdessen eine Verstoffwechselung dieser Verbindungen an, so wäre, da die Injektionen immer auf die gleiche Weise erfolgten, nicht zu erklären, warum bei 3 Injektionsversuchen m^3U und m_2^2G annähernd quantitativ im Urin wiedergefunden wurden. Auch wurde bei demselben Tier (Tupaia B) m_2^2G im 1. Injektionsversuch je nach Auswertungsmodus zu 100 % - 78 % wiedergefunden (s. Abb. 25), während bei dem 2. Injektionsversuch die Wiederfindung für diese Substanz nur ~ 53 % betrug. Eine eventuelle geringfügige Verstoffwechselung von m^3U bzw. m_2^2G bei Tupaia lässt sich allerdings aufgrund der gezeigten Ergebnisse nicht ausschließen. Für m^1G könnte sogar eine stärkere Verstoffwechselung nach intraperitonealer Injektion vorliegen, da die Wiederfindung im Urin grundsätzlich niedriger lag als für m^3U oder m_2^2G (s. Abb. 25 - 27).

Als Kontrollversuch wurde den Tupaia anstelle von Nucleosiden ein entsprechendes Volumen Lösungsmittel injiziert (2.1.3.).

In Abbildung 28 sind die Ergebnisse dieses Kontrollversuchs dargestellt. Die mit I bezeichneten Säulen geben jeweils die gemessene mittlere Ausscheidung der untersuchten Verbindungen pro Tag und Tier

wieder (Mittelwert aus 3 Sammeltagen und 4 Tieren), die gleich 1 gesetzt wurde, ferner die jeweilige relative Standardabweichung. Die mit II bezeichneten Säulen (Mittelwerte derselben Tiere) stellen die Ausscheidung der gemessenen Verbindungen innerhalb von 24 h nach der Lösungsmittel-Injektion dar. Die Ergebnisse zeigen, daß sich die Mittelwerte der Ausscheidung der gemessenen Verbindungen innerhalb von 24 h nach der Injektion (II) kaum von den entsprechenden Mittelwerten der Ausscheidung über 3 Sammel-Tage (I) unterscheiden. Die höheren Standardabweichungen nach der Injektion (II) könnten auf die geringere Probenzahl ($n = 4$) im Vergleich zur Probenzahl ($n = 12$) für die Berechnung der Basisausscheidung (I) zurückzuführen sein. Obwohl geringe Irritationen der Tiere durch die i.p. Injektion des Lösungsmittels nicht auszuschließen sind, konnten erhebliche Einflüsse auf die Ausscheidung der untersuchten Verbindung nicht beobachtet werden.

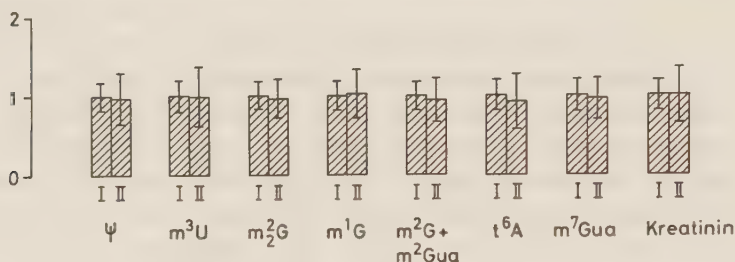


Abbildung 28:

Injektion von Lösungsmittel bei Tupaia A, B, C und D. Die mittlere Ausscheidung der gemessenen Nucleoside bzw. Nucleobasen sowie die von Kreatinin in $nmol/d \pm SD$ betrug: Ψ 3759.9 ± 663.3 ; m^3U 26.6 ± 5.2 ; m^2G 100.4 ± 17.4 ; m^1G 80.8 ± 15.3 ; $m^2G + m^2Gua$ 134.3 ± 22.9 ; t^6A 40.2 ± 7.7 ; m^7Gua 432.2 ± 85.8 und Kreatinin 51400 ± 940 . Weitere Erklärungen s. Text.

3.2. Modifizierte RNA-Kataboliten und Kreatinin in Serum und Plasma

3.2.1. Pseudouridin, 7-Methylguanin, N^2, N^2 -Dimethylguanosin sowie Kreatinin

Ψ , m^7Gua und m^2G werden in Human-Urin in einem weitgehend konstanten Verhältnis zueinander gefunden (Sander et al., 1986a,b). Dabei beträgt das durchschnittliche Mengenverhältnis von $\Psi : m^7Gua : m^2G$ im Urin Er-

wachsener 100 : 19 : 5.7 (Sander et al, 1986b; Schöch et al, 1988a). Das im Urin beobachtete Ausscheidungsmuster dieser RNA-Kataboliten führte zu der Frage, ob die Serumspiegel von Ψ , $m^7\text{Gua}$ und $m_2^2\text{G}$ bei verschiedenen Individuen ähnlich sind, und ob sich mittels der Meßwerte im Serum verschiedener Individuen ein entsprechendes allgemeines Muster der Verhältnisse dieser Verbindungen zueinander in Serum erstellen läßt.

Eigene Messungen waren notwendig, weil bis zum Zeitpunkt dieser Untersuchung kaum publizierte Angaben zu Serumkonzentrationen der hier untersuchten RNA-Kataboliten vorlagen und zudem widersprüchlich waren. Gar keine Angaben gab es zur Konzentration der Nucleobase $m^7\text{Gua}$ im Serum, da allgemein eine Vorreinigungsmethode verwendet wurde (Affinitätschromatographie über ein Phenylborsäure-Gel), die ausschließlich Ribonucleoside erfäßt. Während Colonna et al (1983) die Nachweisbarkeit von $m_2^2\text{G}$ aus Serum nach Vorreinigung über ein Phenylborsäure-Gel und anschließende HPLC-Analyse bezweifelten, betrugen von anderen Autoren publizierte durchschnittliche Serumkonzentrationen 104 nmol/l (Gehrke et al, 1983) bzw. $47 \text{ nmol/l} \pm 43 \%$ (Apell et al, 1986). Die von Levine et al (1975) mittels eines Radioimmunoassays bestimmte mittlere $m_2^2\text{G}$ -Konzentration betrug nur $11.6 \text{ nmol/l} \pm 57 \%$. Die von den gleichen Arbeitsgruppen für Serum bestimmten mittleren Ψ -Konzentrationen unterschieden sich mit 2440 - 4170 nmol/l ebenfalls erheblich voneinander (Colonna et al, 1983; Gehrke et al, 1983; Cimino et al, 1985 und Apell et al, 1986). Levine et al (1975), die Ψ im Serum mittels eines Radioimmunoassays bestimmten, fanden nur eine durchschnittliche Konzentration von 1720 nmol/l. Angaben über Konzentrationen von Ψ , $m^7\text{Gua}$ und $m_2^2\text{G}$ in Plasma existierten bisher nicht.

Mit den neu entwickelten Methoden (2.2.1., 2.2.3.) konnten die Konzentrationen von Ψ , $m_2^2\text{G}$ und $m^7\text{Gua}$ sowohl in Serum als auch in Plasma bestimmt werden (Topp et al, 1985 und 1987). In den Abbildungen 29 - 31 sind die HPLC-Trennungen dieser 3 RNA-Kataboliten in enteweißtem Serum dargestellt. Mit der HPLC-Methode zur Messung von $m^7\text{Gua}$ kann auch Kreatinin bestimmt werden.

Tabelle 24 (S. 101) zeigt die Wiederfindungsraten der untersuchten Verbindungen nach Enteweißung von Serum mittels Ultrafiltration und (im Fall von $m^7\text{Gua}$ und $m_2^2\text{G}$) anschließender Konzentrierung des Filtrats durch Gefriertrocknung (2.2.1.).

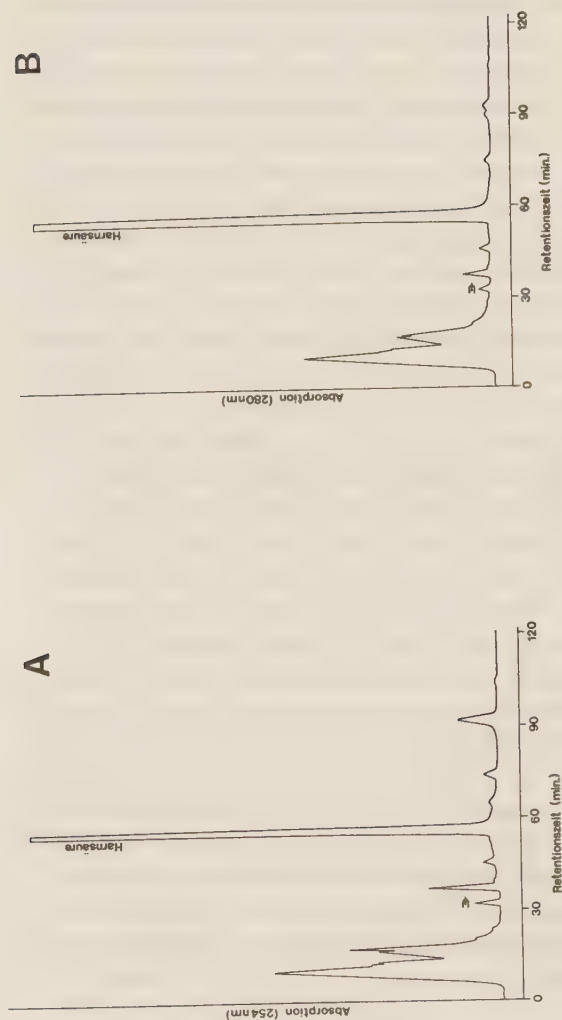


Abbildung 29:
 HPLC-Trennung von γ und Harnsäure in 100 μ l ultrafiltriertem Humanserum; Detektion bei 254 nm (A) und 280 nm (B). Aufarbeitung des Serums und Chromatographie-Bedingungen sind unter 2.2.1 und 2.2.3. beschrieben. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.005 AUFS. Die Ausgangssignale wurden für die Aufzeichnung 128-fach abgeschwächt. Papiervorschub 0.1 cm/min.

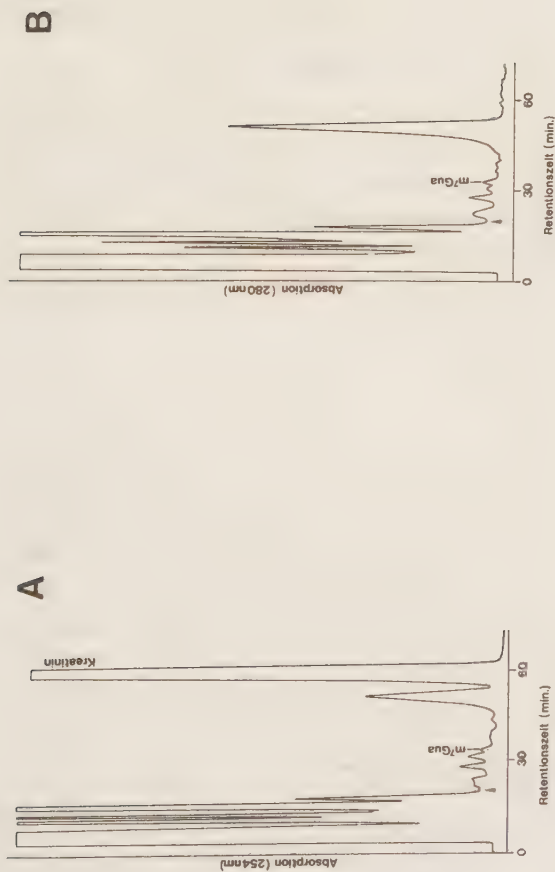


Abbildung 30:

HPLC-Trennung von m⁷Gua und Kreatinin in 200 µl konzentriertem Ultrafiltrat aus Humanserum; Detektion bei 254 nm (A) und 280 nm (B). Aufarbeitung des Serums und Chromatographie-Bedingungen sind unter 2.2.1. und 2.2.3. beschrieben. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.001 AUFS. Die Ausgangssignale wurden für die Aufzeichnung bis zum Pfeil 512-fach, danach 256-fach abgeschwächt. Papiervorschub 0.1 cm/min.

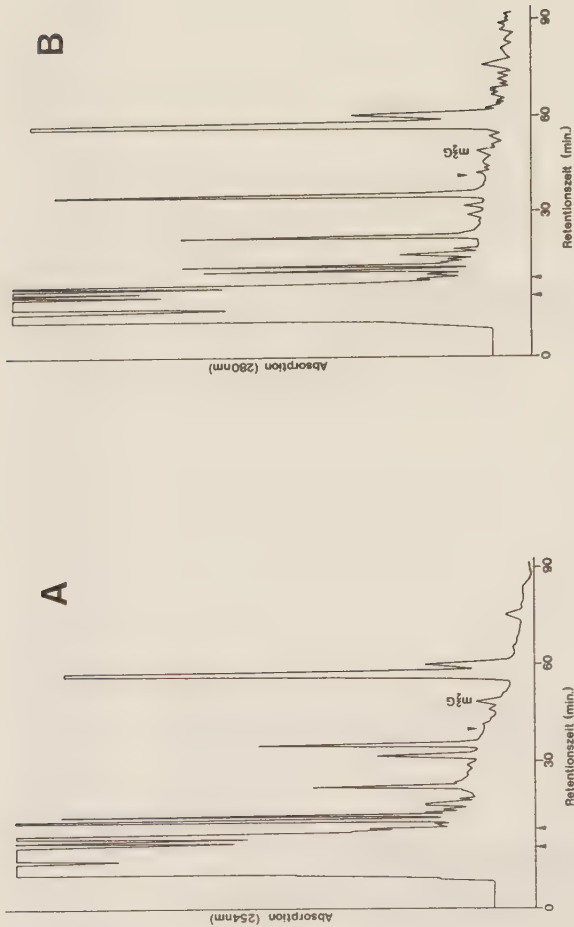


Abbildung 31:

HPLC-Trennung von m_2G in 200 μ l konzentriertem Ultrafiltrat aus Humanserum; Detektion bei 254 nm (A) und 280 nm (B). Aufarbeitung des Serums und Chromatographie-Bedingungen sind unter 2.2.1. und 2.2.3. beschrieben. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug 0.001 AUFS. Die Ausgangssignale wurden für die Aufzeichnung bis zum oberen Pfeil 512-fach, danach 64-fach abgeschwächt. Papiervorschub bis zum 1. unteren Pfeil 0.5 cm/min, bis zum 2. unteren Pfeil 0.25 cm/min, danach 0.1 cm/min.

Während für zugesetztes Ψ und Kreatinin eine hohe Wiederfindung zu verzeichnen ist, liegt diese für $m^7\text{Gua}$ und $m^2_2\text{G}$ im Bereich von 60 %. Die relativ geringen Standardabweichungen zeigen aber, daß auch für die Messung von $m^7\text{Gua}$ und $m^2_2\text{G}$ die Methode gut reproduzierbar ist. Aus Abbildung 32 wird zusätzlich deutlich, daß die Wiederfindung von $m^7\text{Gua}$ bzw. $m^2_2\text{G}$ auch bei Zusatz unterschiedlicher Mengen zu Serum konstant ist.

Tabelle 24:

Prozentuale Wiederfindung von Ψ , $m^7\text{Gua}$, $m^2_2\text{G}$ und Kreatinin nach Zusatz zu Serum (nach Topp et al, 1987)

zugesetzte Verbindung	n	Wiederfindung (%) $\pm$ SD der zugesetzten Verbindung
Ψ^a	10	93.4 $\pm$ 5.9
$m^7\text{Gua}^b$	15	59.9 $\pm$ 4.9
$m^2_2\text{Gua}^b$	14	65.2 $\pm$ 6.7
Kreatinin ^c	11	85.8 $\pm$ 4.5

^a Zur Bestimmung der Wiederfindung von Ψ in Serum wurden 1441 pmol Ψ in 8.5 μl 5 mM Ameisensäure zu 0.4 ml Serum hinzugegeben. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.2.1. beschrieben. Die Serum-Proben stammten von 10 verschiedenen Personen. Ohne Zusätze waren in der Filtratmenge von 100 μl , die mittels HPLC analysiert wurde, durchschnittlich 86.0 ± 15.1 pmol Ψ enthalten. Nach Zusatz waren in 100 μl Filtratmenge bei 100 % Wiederfindung zusätzlich 120.1 pmol Ψ zu erwarten.

^b Die zu Serum zugesetzten $m^7\text{Gua}$ - und $m^2_2\text{G}$ -Mengen sind in Abbildung 32 erläutert. Die Aufarbeitung des Serums erfolgte wie unter 2.2.1. beschrieben. Für die Bestimmung der Wiederfindung von $m^7\text{Gua}$ wurden insgesamt 15 Zusätze zu Serum von 13 Personen gemacht. Für die Bestimmung der Wiederfindung von $m^2_2\text{G}$ erfolgten insgesamt 14 Zusätze zu Serum von 9 Personen. Ohne Zusätze waren in der konzentrierten Filtratmenge von 200 μl , die mittels HPLC analysiert wurde, durchschnittlich 74.7 ± 14.5 pmol $m^7\text{Gua}$ und 19.7 ± 3.7 pmol $m^2_2\text{G}$ enthalten. Die durch die Zusätze bei 100 % Wiederfindung zu erwartenden Mengen sind in Abbildung 32 dargestellt.

^c Zur Bestimmung der Wiederfindung von Kreatinin wurden 60 nmol Kreatinin in 10 μl H_2O zu 0.8 ml Serum hinzugegeben. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.2.1. beschrieben. Ohne Zusätze waren in 100 μl Filtratmenge, die analysiert wurde, durchschnittlich 2120 ± 271.5 pmol Kreatinin enthalten. Nach Zusatz waren bei 100 % Wiederfindung zusätzlich 2730 pmol zu erwarten.

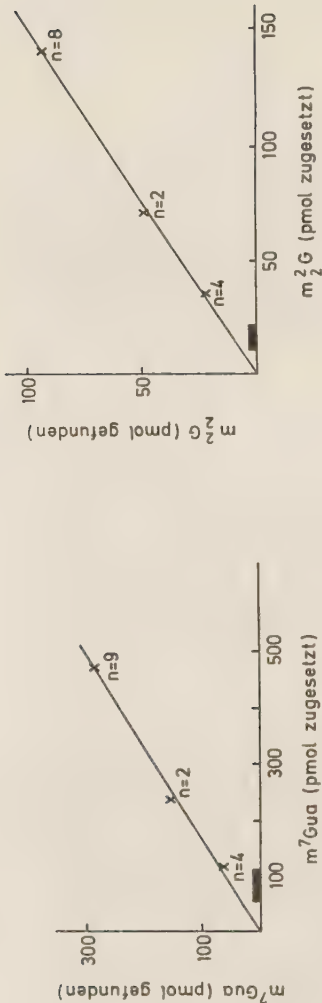


Abbildung 32:
Linearität in der Wiederfindung von $m^7\text{Gua}$ und $m^2\text{G}$ nach Zusatz verschiedener Mengen zu Serum (nach Topp et al, 1987).

$m^7\text{Gua}$ -Stammlösung (2.93 mmol/l 0.1 M Ameisensäure) wurde so mit H_2O verdünnt, daß in den verschiedenen Verdünnungen, die zu 2.4 ml Serum hinzugegeben wurden, folgende Mengen $m^7\text{Gua}$ in 10 μl enthalten waren: 293 pmol, 586 pmol und 1172 pmol. 200 μl des konzentrierten Ultrafiltrats (s. 2.2.1.) wurden mittels HPLC analysiert. Nach Abzug der ohne Zusatz endogen vorhandenen $m^7\text{Gua}$ -Mengen (in 200 μl konzentriertem Filtrat) sollten die gefundenen Mengen bei 100 % Wiederfindung den aus dem Zusatz erwarteten Mengen in 200 μl Filtrat entsprechen. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden beträgt $r^2 = 0.98$. Für die Zusätze von $m^2\text{G}$ wurde die Stammlösung (3.53 mmol/l 0.1 M Ameisensäure) so mit H_2O verdünnt, daß in den Verdünnungen, die zu 2.4 ml Serum hinzugegeben wurden, folgende Mengen $m^2\text{G}$ in 10 μl enthalten waren: 88.3 pmol, 176.5 pmol und 353 pmol. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden zwischen den Punkten der aus den Zusätzen erwarteten $m^2\text{G}$ -Mengen in 200 μl konzentriertem Ultrafiltrat und den gefundenen Mengen beträgt $r^2 = 0.953$. Die Balken oberhalb der Abzissen zeigen jeweils den Bereich der endogenen $m^7\text{Gua}$ - bzw. $m^2\text{G}$ -Mengen an, die in 200 μl konzentriertem Ultrafiltrat ohne Zusätze enthalten waren.

In Tabelle 25 (S. 104) sind in der linken Spalte die Mittelwerte der im Serum verschiedener Personen bestimmten Konzentrationen der RNA-Kataboliten dargestellt, außerdem der Mittelwert der Kreatininkonzentrationen. Die geringen Standardabweichungen zeigen, daß die interindividuellen Schwankungen der Serumspiegel aller hier gemessenen Verbindungen nicht erheblich sind.

Folglich ist die Angabe eines durchschnittlichen molaren Verhältnisses von Ψ : $m^7\text{Gua}$: $m^2\text{G}$ in Serum sinnvoll. Dieses (auf $\Psi = 100$ normierte) Verhältnis in Serum von $100 : 4.7 : 1.1$ (dargestellt in der mittleren Spalte) unterscheidet sich erheblich von dem auf $\Psi = 100$ normierten durchschnittlichen Verhältnis dieser Verbindungen im Urin, das $100 : 19 : 5.7$ beträgt (rechte Spalte in Tab. 25). Dieser Befund läßt sich durch Annahme unterschiedlicher Ausscheidungsmechanismen für Ψ , $m^7\text{Gua}$ und $m^2\text{G}$ in der Niere erklären. Die in der Tabelle gezeigten Daten zur Kreatininkonzentration im Serum und der Bezug der Serum- bzw. Urindaten auf Kreatinin werden im Zusammenhang mit denkbaren Ausscheidungsmechanismen unter 4.7. diskutiert.

Um mögliche Konzentrationsänderungen der gemessenen modifizierten RNA-Kataboliten während der Blutgerinnung auszuschließen (das Blut wurde zur Herstellung von Serum 1 h bei Raumtemperatur stengelassen), wurden zur Kontrolle Bestimmungen in Plasma durchgeführt (Tab. 26, S. 105). Die nach Ultrafiltration für Plasma ermittelten Konzentrationen unterscheiden sich nicht wesentlich von den für Serum ermittelten. Die in der Legende von Tabelle 26 angegebenen Wiederfindungsraten der gemessenen Verbindungen nach Aufarbeitung des Plasmas entsprechen weitgehend denjenigen, die für Serum bestimmt wurden. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß sich die Konzentrationen der untersuchten RNA-Kataboliten im Serum während der Blutgerinnung nicht wesentlich verändern.

3.2.2. Umwandlung von 7-Methylguanosin zu 7-Methylguanin im Serum

Das modifizierte Nucleosid $m^7\text{G}$ wird in Human-Urin nicht gefunden (Mrochek et al, 1974). Gehrke & Kuo (1985) beschrieben, aber das Vorkommen von $m^7\text{G}$ in Humanserum, dessen Ribonucleoside sie über ein

Tabelle 25:
Konzentrationen von Ψ , m^7Gua , m^2G und Kreatinin in Serum und Urin (nach Topp et al., 1987)

Verbindung	Konzentration im Serum ^a (nmol/l)	Relative Konzentration im Serum ^b (nmol/ μ mol Kreatinin)	normiert auf $\Psi = 100$	Relative Konzentration im Urin ^c (nmol/ μ mol Kreatinin)	normiert auf $\Psi = 100$
Ψ ^d	2760.0 $\pm$ 460.0	40.60	100	25.30 $\pm$ 3.10	100
m^7Gua ^e	129.7 $\pm$ 24.0	1.91	4.7	4.80 $\pm$ 0.89	19.0
m^2G ^f	31.0 $\pm$ 3.7	0.46	1.1	1.43 $\pm$ 0.39	5.7
Kreatinin ^g	68000.0 $\pm$ 8700.0				

^a Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ SD.

^b Zur Bestimmung der relativen Konzentrationen der Substanzen im Serum wurden die Mittelwerte durch die mittlere Kreatininkonzentration geteilt.

^c Die Mittelwerte $\pm$ SD der relativen Konzentrationen der Substanzen im Urin wurden von 18 Frauen und 14 Männern bestimmt (Sander et al., 1986a,b), Alter 17 bis 55 Jahre.

^d Ψ -Konzentrationen wurden im Serum von 6 Frauen und 4 Männern bestimmt, Alter 24 bis 58 Jahre.

^e m^7Gua -Konzentrationen wurden im Serum von 8 Frauen und 5 Männern gemessen, Alter 24 bis 58 Jahre.

^f m^2G -Konzentrationen wurden im Serum von 5 Frauen und 4 Männern gemessen, Alter 24 bis 44 Jahre.

^g Kreatinin-Konzentrationen wurden im Serum von 8 Frauen und 3 Männern bestimmt, Alter 24 bis 44 Jahre.

Tabelle 26:

Konzentrationen von Ψ , m^7Gua , m^2_2G und Kreatinin in Plasma

Verbindung	Konzentration (nmol/L)		
Ψ^a	3013	$\pm$	609.3
m^7Gua^b	141.6	$\pm$	24.6
$m^2_2G^c$	25.2	bzw.	36.0
Kreatinin ^d	57500	$\pm$	2950

^a Plasma von 3 Personen (1 Frau, 2 Männer). Die durchschnittliche Wiederfindung (n = 3) von zugesetztem Ψ (1695 pmol in 10 μ l 5 mM Ameisensäure) betrug 93.8 %.

^b Plasma von 3 Personen (2 Frauen, 1 Mann). Die durchschnittliche Wiederfindung (n = 2) von zugesetztem m^7Gua (1128 pmol in 10 μ l 4 mM Ameisensäure) betrug 53.7 %.

^c Plasma von 2 Frauen. Die durchschnittliche Wiederfindung (n = 2) von zugesetztem m^2_2G (176.5 pmol in 10 μ l 0.5 mM Ameisensäure) betrug 63.9 %.

^d Plasma von 3 Frauen. Die durchschnittliche Wiederfindung (n = 3) von zugesetztem Kreatinin (60 nmol in 10 μ l H_2O) betrug 92.8 %.

Phenylborsäure-Gel anreicherten (Davis et al, 1977). Mit diesem Verfahren (2.2.2.) und anschließender HPLC-Analyse (2.2.3.) konnten wir allerdings kein m^7G in Humanserum nachweisen, obwohl authentisches m^7G mit dieser Methode von uns quantitativ wiedergefunden wurde.

Dagegen konnte gezeigt werden, daß zu Serum hinzugegebenes m^7G größtenteils in die modifizierte Base m^7Gua umgewandelt wird (Topp et al, 1987). Aus Tabelle 27 (S. 106) ist ersichtlich, daß zu Serum von 4 verschiedenen Personen zugesetztes m^7G nach Ultrafiltration und Konzentrierung (2.2.1.) zu 66 - 80 % (nach Ausbeutekorrektur, s. Tab. 24) als m^7Gua wiedergefunden wurde. Zur Kontrolle wurde authentisches m^7G in H_2O (mit 8.3 μ M Ameisensäure aus der Stammlösung) wie Serum behandelt. Dabei zeigte es sich, daß auch im Kontrollversuch anscheinend ein geringer Anteil von m^7G in m^7Gua umgewandelt wurde. Das Ausmaß dieser Umwandlung in H_2O betrug jedoch nur $\sim 1/7$ derjenigen in Serum (Tab. 27).

Tabelle 27:

Umwandlung von m⁷G zu m⁷Gua in Serum. Enteiweißung mittels Ultrafiltration
(nach Topp et al, 1987)

Person	m ⁷ G (pmol zugesetzt) ^a	m ⁷ Gua (pmol gefunden) ^b	% Umwandlung
1	619.6	494.5	79.8
2	619.6	408.5	65.9
3	619.6	488.5	78.8
4	619.6	456.6	73.7
Kontrolle ^c	619.6	70.3	11.3

^a Zu 2.4 ml Serum wurden 10 µl m⁷G (619.6 pmol in 2 mM Ameisensäure) zugesetzt. Die Proben wurden wie unter 2.2.1. beschrieben behandelt.

^b Die in m⁷Gua umgewandelte m⁷G-Menge wurde unter Berücksichtigung von 59.9 % Wiederfindung für m⁷Gua (s. Tab. 24, S. 101) berechnet.

^c Zur Kontrolle (n = 3) wurden 10 µl m⁷G (619.6 pmol in 2 mM Ameisensäure) zu 2.4 ml H₂O zugesetzt und diese wie Serumproben behandelt. Für die Berechnung der in m⁷Gua umgewandelten Menge wurde für m⁷Gua ebenfalls eine Wiederfindung von 59.9 % zugrunde gelegt.

In einem weiteren Versuch wurde Serum nach Zusatz von m⁷G verschieden lange inkubiert, durch Zugabe von Aceton enteiweißt und danach konzentriert (2.2.1.). Ein Aliquot dieser Probe wurde mittels HPLC auf gebildetes m⁷Gua hin analysiert (Abb. 33, S. 107).

Eine Quantifizierung von umgewandeltem m⁷Gua konnte nur bei 280 nm vorgenommen werden (eine Auswertung der Absorption bei 254 nm war nicht möglich, da in der m⁷Gua-Position ein Störpeak auftrat). Aus Tabelle 28 (S. 108) wird ersichtlich, daß die Umwandlung schon innerhalb von 5 min stattfand und daß die umgewandelte m⁷Gua-Menge während der weiteren untersuchten Inkubationszeiten konstant blieb. Die in der Tabelle dargestellten Zahlen für die entstandenen m⁷Gua-Mengen sind nicht Ausbeute-korrigiert. Bei Annahme einer Ausbeute von 48 % (bei einer Person gemessen) für alle untersuchten Proben ergäbe sich eine korrigierte durchschnittliche Umwandlung von m⁷G zu m⁷Gua von ~90 %. Die nach sofortiger Enteiweißung entstandene m⁷Gua-Menge (Person 2, 0 min) ist ein ungefährender Wert, da eine exakte Quantifizierung gerin-

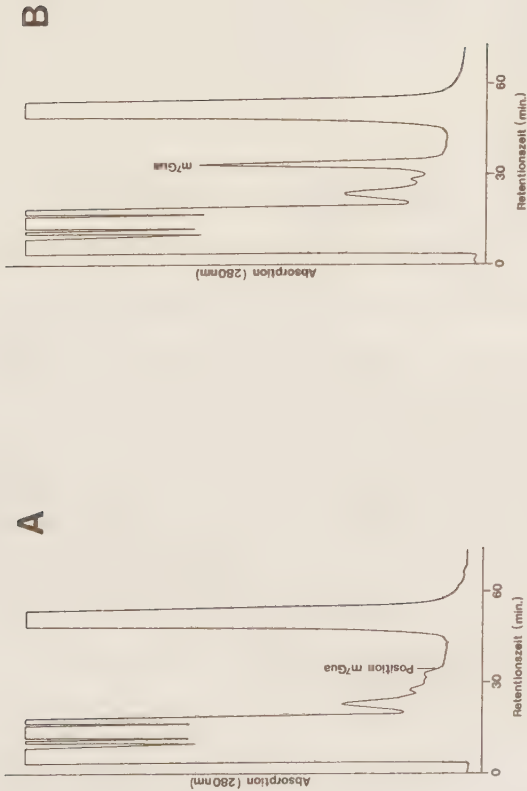


Abbildung 33:

HPLC-Trennung von $m^7\text{Gua}$ in einem $200\ \mu\text{L}$ -Aliquot von Humanserum nach Enteiweißung mit Aceton (2.2.1.). Die Chromatographie-Bedingungen sind unter 2.2.3. beschrieben. In (A) ist ein Chromatogramm des Serums von Person 1 (Tab. 28) ohne $m^7\text{G}$ -Zusatz dargestellt. Abbildung (B) zeigt das nach Zusatz von $m^7\text{G}$ zum gleichen Serum entstandene $m^7\text{Gua}$. Die Empfindlichkeitseinstellung der Detektoren betrug $0.002\ \text{AUFS}$. Die Ausgangssignale wurden fur die Aufzeichnung 128-fach abgeschwacht, Papiervorschub $0.1\ \text{cm/min}$.

Tabelle 28:

Umwandlung von m⁷G zu m⁷Gua in Serum. Enteiweißung mit Aceton, Blindwerte (ohne m⁷G-Zusatz) sind subtrahiert.

Serum von Person	Inkubations- zeit (min)	m ⁷ G ^a (pmol zugesetzt)	m ⁷ Gua ^b (pmol gefunden)	% Umwandlung ^c
1	60 ^d	6196	3310	53.4
2	60 ^d	6196	2480	40.0
3	5 ^e	6196	2588	41.8
"	10 ^e	6196	2629	42.4
"	20 ^e	6196	2465	39.8
2	0	6196	~ 213	~ 3.4
"	5 ^e	6196	2670	43.1
"	10 ^e	6196	2752	44.4
"	20 ^e	6196	2670	43.1

^a Zu 2.4 ml Serum wurden 20 µl m⁷G (6196 pmol m⁷G in 10 mM Ameisensäure) zugesetzt. Die zugesetzte m⁷G-Menge entsprach ungefähr dem 20-fachen der im Serum vorliegenden m⁷Gua-Menge. Die Proben wurden wie unter 2.2.1. (Enteiweißung mit Aceton) beschrieben behandelt.

^b Bestimmt wurde die nach m⁷G-Zugabe zusätzlich in 200 µl-Aliquots der aufgearbeiteten Proben enthaltene m⁷Gua-Menge. Zur Ausbeutebestimmung von m⁷Gua wurden zu 2.4 ml Serum 1128 pmol m⁷Gua in 10 µl 4 mM Ameisensäure zugesetzt (n = 2). Die Ausbeute von m⁷Gua betrug nach 60 min Inkubation des Serums bei Raumtemperatur und anschließender Aufarbeitung durchschnittlich 48 %.

^c Die Werte der prozentualen Umwandlung sind nicht Ausbeute-korrigiert (im Gegensatz zu den Werten in Tab. 27, S. 106).

^d Inkubationen erfolgten 60 min bei Raumtemperatur (~25° C). Für die Referenzwerte (ohne m⁷G-Zugabe) wurde der Ansatz nach Zugabe von 20 µl 10 mM Ameisensäure ebenfalls 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

^e Die Inkubationen erfolgten bei 35° C.

ger m⁷Gua-Mengen nach Enteiweißung von Serum mit Aceton mit der verwendeten HPLC-Methode nicht möglich war (vgl. Abb. 33, A und B).

Um beurteilen zu können, ob eine Umwandlung von m⁷G in m⁷Gua durch die Aufarbeitungsmethode verursacht werden kann, wurde m⁷G in H₂O, das mit Phosphatpuffer pH 7 und NH₄OH auf pH 7.2 - 7.5 eingestellt wurde, 25 min bei 35° C inkubiert. Zu 2.4 ml dieser Lösung wurden 6196 pmol

m^7G in 20 μl 10 mM Ameisensäure gegeben, und der Ansatz wurde nach der Inkubation wie die Serumproben weiterbehandelt (Zugabe von Aceton, Konzentrierung durch Gefriertrocknung, 2.2.1.) Nach dieser Prozedur wird m^7G vollständig wiedergefunden. Die verwendete Aufarbeitungsmethode hat also keinen Einfluß auf die Entstehung von m^7Gua aus m^7G . Demnach ist es eine Eigenschaft des Serums, m^7G in m^7Gua umzuwandeln. Diese Umwandlung geschieht schnell (≤ 5 min). Dies erklärt, daß m^7G weder von Mrochek et al (1974) in Urin noch von uns (Topp et al, 1987) in Serum gefunden wurde. Die gegenteilige Angabe von Gehrke & Kuo (1985) ist demnach unwahrscheinlich.

3.3. Inkubation von modifizierten Ribonucleosiden bzw. modifizierten Nucleobasen mit Gewebeextrakten

3.3.1. Inkubation von modifizierten Ribonucleosiden bzw. Nucleobasen mit postribosomalen Überständen aus Rattenleber

Ein Vergleich der im Urin von Ratten relativ zu t^6A ausgeschiedenen Mengen an m^2G , m^1G und m_2^2G mit der berechneten durchschnittlichen Verteilung dieser modifizierten Bausteine in cytoplasmatischer Säuger-tRNA führte zu der Schlußfolgerung, daß m^2G , m^1G und m_2^2G bei Ratten wahrscheinlich teilweise verstoffwechselt werden (3.1.4.). Zur experimentellen Überprüfung dieser Schlußfolgerung wurden m^2G , m^1G und m_2^2G sowie die zugehörigen modifizierten Nucleobasen mit zellfreien Überständen aus Rattenleberhomogenaten inkubiert (2.3.1., 2.3.3.).

Abbildung 34 (S. 110) ist zu entnehmen, daß von den untersuchten zugesetzten modifizierten Nucleosiden m^2G im Inkubationsansatz am schnellsten abnahm. So wurden nach 20 min Inkubation nur noch 24 % der nach sofortiger Proteinfällung gemessenen m^2G -Menge gefunden; nach 50 min Inkubation war kein m^2G mehr nachweisbar.

Bei m^1G wurde erst nach 50 min eine deutliche Abnahme (~ 28 %) der zugesetzten Menge beobachtet, wobei die Werte für zellfreie Überstände aus Leber von Fischer- bzw. Wistar-Ratten weitgehend gleich waren. Nach längerer Inkubation wurde aber auch m^1G vollständig eliminiert.

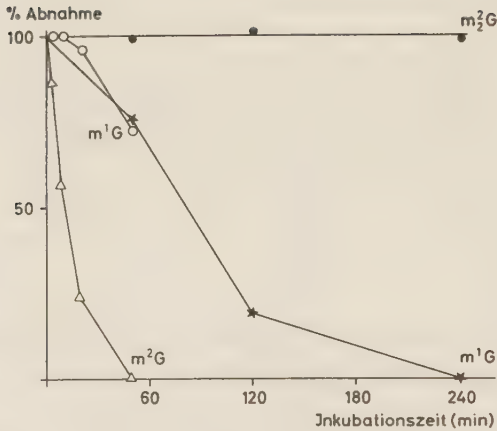


Abbildung 34:

Inkubation von m^2G , m^1G und m^2G mit zellfreiem Überstand aus Rattenleber

Dargestellt ist die Abnahme der zugesetzten Nucleoside nach verschiedenen langen Inkubationszeiten bei 37° C relativ zur gemessenen Menge bei 0 min (sofortige Proteinfällung nach Nucleosidzugabe), die gleich 100 % gesetzt wurde. Inkubation und anschließende Reinigung sowie die HPLC-Messung der Nucleoside wurden wie unter 2.3.3. und 2.3.4. beschrieben durchgeführt.

Zur Inkubation von m^2G (Δ) mit zellfreiem Überstand aus Leber einer Fischer 344-Ratte enthielten die Ansätze jeweils 17.7 nmol m^2G und zellfreien Überstand von 0.0187 g Lebergewebe (946.5 nmol m^2G /g Gewebe).

Zur Inkubation von m^1G mit zellfreiem Überstand aus Leber einer Fischer 344-Ratte ($\circ$) bzw. einer Wistar-Ratte ($*$) enthielten die Ansätze jeweils 19.7 nmol m^1G und zellfreien Überstand von 0.023 g Lebergewebe (856.5 nmol m^1G /g Gewebe).

Zur Inkubation von m^2G ($\bullet$) mit zellfreiem Überstand aus Leber einer Wistar-Ratte enthielten die Ansätze 17.4 nmol m^2G und zellfreien Überstand von 0.023 g Lebergewebe (756.5 nmol m^2G /g Gewebe).

Obwohl für m^2G bei Ratten aufgrund der relativ geringen im Urin ausgeschiedenen Mengen (s. 3.1.4.) ebenfalls eine Verstoffwechselung in vivo anzunehmen ist, konnte ein Abbau durch zellfreien Überstand aus Leber selbst nach 4 h Inkubation nicht beobachtet werden.

Insgesamt erhärten diese Befunde die aufgrund von Messungen in Urin vermuteten unterschiedlichen Verstoffwechselungsraten der untersuchten Verbindungen in vivo: $m^2G > m^1G > m^2G$ (vgl. 3.1.4.).

Die offensichtliche Verstoffwechselung von m^2G und m^1G durch zellfreien Überstand aus Rattenleber führte zu der Frage, ob als mögliche Folgeprodukte die entsprechenden Nucleobasen nachweisbar sind bzw. ob diese durch Rattenleber ebenfalls in vitro verstoffwechselt werden. Letzteres war zu vermuten, da die modifizierten Nucleobasen m^2Gua und m^1Gua in Ratten-Urin nicht gefunden wurden (s. 3.1.4.).

Inkubation von m^2G bzw. m^1G mit zellfreiem Leber-Überstand führte nicht zur Bildung nachweisbarer Mengen der entsprechenden Nucleobasen m^2Gua und m^1Gua als mögliche Folgeprodukte. Zur Klärung der Frage, ob m^2Gua und m^1Gua wie die entsprechenden Nucleoside in zellfreiem Überstand aus Rattenleber verstoffwechselt werden, wurde eine Inkubation von m^2Gua bzw. m^1Gua in diesem System durchgeführt.

Aus Tabelle 29 (S. 112) wird ersichtlich, daß nach 50 min Inkubation im Ansatz kein m^2Gua mehr nachweisbar war. Zur Kontrolle wurden in einem weiteren Ansatz die Proteine im zellfreien Überstand nach m^2Gua -Zugabe sofort denaturiert. Anschließend wurde 50 min bei 37° C inkubiert. Bei diesem Ansatz zeigte sich für m^2Gua keine deutliche Abnahme.

Auch zugesetztes m^1Gua wurde nach 50 min Inkubation vollständig aus dem Ansatz eliminiert. Diese Abnahme erfolgt im zellfreien Überstand aus Rattenleber offensichtlich schneller als die Abnahme des entsprechenden Nucleosids nach gleicher Inkubationszeit (vgl. Abb. 34), trotz ähnlicher zugesetzter Mengen (856.5 nmol m^1G bzw. 669.6 nmol m^1Gua/g Gewebe).

Insgesamt machen die Ergebnisse deutlich, daß nicht nur die modifizierten Nucleoside m^1G und m^2G , sondern auch ihre mutmaßlichen Folgeprodukte m^1Gua und m^2Gua in diesem in vitro-System offensichtlich verstoffwechselt werden.

Im Gegensatz dazu konnte wie schon für das Nucleosid m^2G auch für die

entsprechende Nucleobase $m_2^2\text{Gua}$ keine Verstoffwechselung im zellfreien Überstand aus Rattenleberhomogenat festgestellt werden (Tab. 29).

Tabelle 29:

Inkubation von $m^2\text{Gua}$, $m^1\text{Gua}$ und $m_2^2\text{Gua}$ mit zellfreiem Überstand aus Rattenleber

Verbindung	Wiederfindung (%)	Wiederfindung (%)
	ohne Inkubation (t_0)	nach 50 min Inkubation
$m^2\text{Gua}^a$	63.9	0
$m^2\text{Gua}^b$ (Kontrolle)	70.6	63.9
$m^1\text{Gua}^c$	97.0	0
$m_2^2\text{Gua}^d$	107.1	98.3

Dargestellt ist die prozentuale Wiederfindung von modifizierten Nucleobasen nach Zusatz zu zellfreiem Überstand aus Rattenleber (Wistar) und Vorreinigung (2.3.4.). Die Inkubation erfolgte bei 37° C wie unter 2.3.3. beschrieben.

^a Die Ansätze enthielten 10.1 nmol $m^2\text{Gua}$ und zellfreien Überstand aus 0.0187 g Lebergewebe (540.1 nmol $m^2\text{Gua}$ /g Gewebe).

^b Für die Kontrolle wurden die Proteine in 4 Ansätzen sofort nach $m^2\text{Gua}$ -Zusatz durch Zugabe von TCA denaturiert. 2 Ansätze wurden anschließend zusätzlich 50 min bei 37° C inkubiert.

^c Die Ansätze enthielten 15.4 nmol $m^1\text{Gua}$ und zellfreien Überstand aus 0.023 g Leber (669.6 nmol $m^1\text{Gua}$ /g Gewebe).

^d Die Ansätze enthielten 25.0 nmol $m_2^2\text{Gua}$ und zellfreien Überstand aus 0.023 g Leber (1087.0 nmol $m_2^2\text{Gua}$ /g Gewebe).

3.3.2. Inkubation von N^2,N^2 -Dimethylguanosin mit Rohhomogenaten aus verschiedenen Rattengeweben

Da das im Ratten-Urin gefundene Mengenverhältnis von m_2^2G zu t^6A (3.1.4.) eine Verstoffwechselung von m_2^2G bei der Ratte vermuten läßt, eine in vitro-Verstoffwechselung in postribosomalem Überstand aus Ratte-leber aber weder für m_2^2G noch für das mögliche Folgeprodukt m_2^2Gua gezeigt werden konnte (3.3.1.), wurde authentisches m_2^2G zusätzlich mit Rohhomogenaten aus Leber, Niere und Milz inkubiert. Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse dieser Inkubationsversuche.

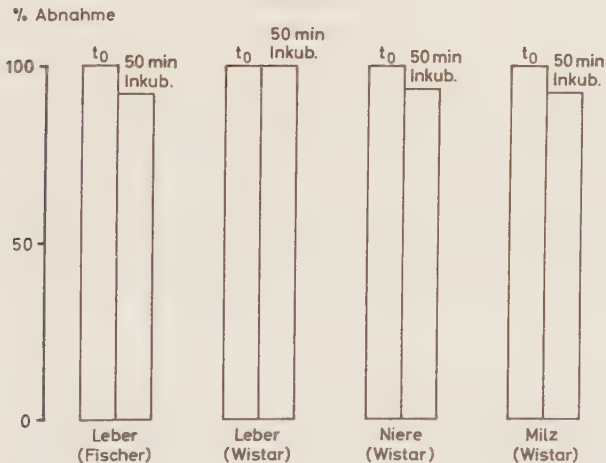


Abbildung 35:

Inkubation von m_2^2G mit Rohhomogenaten aus verschiedenen Geweben von Ratten

Inkubationsbedingungen sowie die weitere Aufarbeitung und HPLC-Analyse von m_2^2G s. 2.3.2. und 2.3.4. Die Ansätze enthielten bei der Fischer-Ratte: 104.1 nmol m_2^2G und Homogenat aus 0.26 g Leber (400 nmol/g Gewebe); bei der Wistar-Ratte: 105.9 nmol m_2^2G und Homogenat aus 0.64 g Leber (165.5 nmol/g Gewebe) bzw. 36.3 nmol m_2^2G und Homogenat aus 0.52 g Niere (69.8 nmol/g Gewebe) bzw. 36.3 nmol m_2^2G und Homogenat aus 0.068 g Milz (533.8 nmol/g Gewebe).

Bei keinem der Inkubationsansätze war nach 50 min eine deutliche Abnahme von m_2^2G zu erkennen, so daß bei der Ratte eine in vitro-Verstoffwechselung von m_2^2G auch bei Verwendung von Rohhomogenaten aus verschiedenen Geweben nicht nachweisbar war.

3.3.3. Inkubation von modifizierten Ribonucleosiden bzw. Nucleobasen mit postribosomalen Überständen aus Tupaialeber

Im Gegensatz zu den Befunden in Ratten-Urin wurden m_2^2G , m^1G und m^2G (+ m^2Gua) in Tupaia-Urin in einem Mengenverhältnis zu t^4A gefunden, welches der berechneten durchschnittlichen Verteilung in cytoplasmatischer Säuger-tRNA entspricht (vgl. Tab. 17, S. 75). Dies war ein erster Anhaltspunkt dafür, daß diese Verbindungen bei Tupaias annähernd quantitativ ausgeschieden werden dürften. Auch das modifizierte Nucleosid m^3U wurde in Tupaia-Urin in demjenigen Mengenverhältnis zum ermittelten ψ -Anteil aus rRNA gefunden, das für diese beiden Verbindungen durchschnittlich in cytoplasmatischer rRNA vorliegt (vgl. Tab. 19, S. 78). Durch intraperitoneale Injektion von m^3U und m_2^2G bei Tupaias konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß injiziertes m^3U und m_2^2G annähernd quantitativ in Urin ausgeschieden werden (s. 3.1.8).

Da diese Ergebnisse eine weitgehende Nichtverstoffwechselung von m^3U , m_2^2G , m^1G und m^2G + m^2Gua bei Tupaias sehr wahrscheinlich machen, Umsetzungen aber nicht völlig ausschließen, wurden diese RNA-Kataboliten zusätzlich mit zellfreiem Überstand aus Tupaialeber inkubiert.

Aus Tabelle 30 (S. 115) geht hervor, daß m^2G in zellfreiem Überstand aus Tupaialeber nach 50 min Inkubation völlig erhalten blieb. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Gegensatz zu dem entsprechenden Befund mit zellfreiem Überstand aus Rattenleber (Abb. 34, S. 110). Die zugesetzten Mengen an m^2G pro g Ausgangsgewebe waren in beiden Versuchen vergleichbar (Tupaia 708 nmol m^2G , Ratte 946.5 nmol m^2G).

Auch m^1G zeigte nach 50 min Inkubation mit zellfreiem Überstand aus Tupaialeber keine Abnahme; mit Rattenleberüberstand war nach gleicher Inkubationszeit eine Abnahme von $\sim 30\%$ zu beobachten (vgl. Abb. 34, S. 110).

Tabelle 30:

Inkubation von m^2G , m^1G , m_2^2G , m^3U und G mit zellfreiem Überstand aus Tupaialeber

Verbindung	Wiederfindung (%)	Wiederfindung (%)
	ohne Inkubation (t_0)	nach 50 min Inkubation
m^2G	99.5	97.3
m^1G	104.6	103.2
m_2^2G	99.5	97.3
m^3U	60.0	60.0
G	97.9	6.7

Dargestellt ist die prozentuale Wiederfindung von Nucleosiden nach Zusatz zu zellfreiem Überstand aus Tupaialeber und Aufarbeitung (2.3.4.). Die Inkubation erfolgte bei 37° C wie unter 2.3.3. beschrieben.

Getrennte Ansätze enthielten jeweils 17.7 nmol m^2G , 19.7 nmol m^1G , 17.4 nmol m_2^2G , 19.5 nmol m^3U , 23.7 nmol G und zellfreien Überstand aus 0.025 g Leber (entsprechend, in nmol/g Gewebe: 708 m^2G , 788 m^1G , 696 m_2^2G , 780 m^3U , 948 G).

Ebenso war bei m_2^2G bzw. m^3U nach 50 min Inkubation keine Abnahme erkennbar. Zur Überprüfung der Frage, ob der verwendete zellfreie Überstand aus Tupaialeber Nucleoside überhaupt umsetzte, wurde eine Inkubation von Guanosin durchgeführt. Wie aus Tabelle 30 hervorgeht, verschwand G nach 50 min Inkubation im Gegensatz zu den untersuchten modifizierten Nucleosiden fast vollständig.

Daß Enzymaktivität in den Inkubationsansätzen vorhanden war, bestätigt auch die gleichzeitig gemessene Zunahme des endogenen I sowie die Abnahme des endogenen A (Tab. 31, S. 116).

Somit war eine Verstoffwechselung der modifizierten Nucleoside m^1G , m^2G und m_2^2G in postribosomalem Überstand aus Tupaialeber nicht nachweisbar.

Tabelle 31:

Zunahme von I bzw. Abnahme von A in zellfreiem Überstand aus Tupaialeber bei den in Tabelle 30 erläuterten Inkubationsversuchen mit modifizierten Nucleosiden.

Inkubationsversuch mit	pmol I nach 0 min	pmol I nach 50 min	% Zunahme während der Inkubation	pmol A nach 0 min	pmol A nach 50 min	% Abnahme während der Inkubation
m ³ U	474.3	747.7	57.7	33.7	10.5	68.9
m ² G	454.5	1078.3	137.2	34.0	6.7	80.3
m ² G	471.9	754.2	59.8	36.2	14.8	59.1
m ¹ G	556.9	708.8	27.3	27.1	12.8	52.8

Gemessen wurde die I- bzw. A-Menge in 100 µl Probenvolumen, das mittels HPLC analysiert wurde. Die Inkubationsansätze waren identisch mit den in Tabelle 30 beschriebenen.

Zusätzlich wurden Inkubationsversuche mit entsprechenden modifizierten Nucleobasen durchgeführt. Aus Tabelle 32 geht hervor, daß der größte Teil des zugesetzten m^1Gua innerhalb von 50 min Inkubation aus dem Ansatz eliminiert wurde, während zugesetztes m_2^2Gua , wie bei der Inkubation mit zellfreiem Überstand aus Rattenleber, völlig erhalten blieb.

Bei der Inkubation von m^2Gua zeigte sich eine Abnahme von $\sim 30\%$ relativ zu der Menge, die ohne Inkubation nach Vorreinigung wiedergefunden wurde. Allerdings war die Wiederfindung von m^2Gua nach Zusatz zu zellfreiem Leber-Überstand unvollständig ($\sim 60\%$; vgl. Tab. 29, S. 112).

Tabelle 32:

Inkubation von m^2Gua , m^1Gua und m_2^2Gua mit zellfreiem Überstand aus Tupaialeber.

Verbindung	Wiederfindung (%)	
	ohne Inkubation	nach 50 min Inkubation
m^2Gua	56.1	38.3
m^1Gua	86.8	15.3
m_2^2Gua	98.4	99.0

Dargestellt ist die prozentuale Wiederfindung von modifizierten Nucleobasen nach Zusatz zu zellfreiem Überstand aus Tupaialeber und Vorreinigung (2.3.4.). Die Inkubation erfolgte bei $37^\circ C$ wie unter 2.3.3. beschrieben.

Getrennte Ansätze enthielten jeweils 10.1 nmol m^2Gua , 15.4 nmol m^1Gua , 25 nmol m_2^2Gua und zellfreien Überstand von 0.025 g Leber (entsprechend in nmol/g Gewebe: 404 m^2Gua , 616 m^1Gua , 1000 m_2^2Gua).

Im Vergleich zum entsprechenden Ergebnis mit Überstand aus Rattenleber (vgl. Tab. 29, S. 112) erfolgte die Abnahme von m^2Gua bei Inkubation mit zellfreiem Überstand aus Tupaialeber langsamer, obgleich die angebotenen Substratmengen ähnlich waren (Tupaia: 404 nmol/g Leber, Ratte: 540 nmol/g Leber).

Insgesamt stützen die Ergebnisse der in vitro-Inkubationsversuche mit m^3U , m^1G und m^2G die aufgrund der relativen Häufigkeiten dieser Verbindungen im Urin (vgl. Tab. 17 u. 19, S. 75 u. 78) aufgestellte These, daß diese modifizierten Nucleoside von Tupaia weitgehend unverändert ausgeschieden werden. Allerdings fällt auf, daß eine Abspaltung der Ribose von m^2G bei der Inkubation mit zellfreiem Überstand aus Leber nicht beobachtet werden konnte, obwohl die modifizierte Nucleobase m^2Gua als Ausscheidungsprodukt in Tupaia-Urin gefunden wurde (vgl. Tab. 14, S. 69). Zugewetztes m^2Gua nahm dagegen in zellfreiem Überstand teilweise ab. Die in Tupaia-Urin ausgeschiedenen Mengen von $m^2G + m^2Gua$ (vgl. 3.1.4.; Tab. 17, S. 75) lassen allerdings eine quantitative Ausscheidung beider Verbindungen in vivo bei diesen Tieren vermuten.

4. Diskussion

4.1. Ausscheidung tRNA-spezifischer modifizierter RNA-Kataboliten: Vergleich mit der durchschnittlichen Verteilung in cytoplasmatischer tRNA

Bei Beginn dieser Arbeit lag für ein tRNA-spezifisches Nucleosid (t^4A ; Tab. 1, S. 5) die Beschreibung der quantitativen Ausscheidung im Urin von Mensch und Ratte vor (Hong et al, 1973). Es lag daher nahe, dieses modifizierte Nucleosid als Bezugssubstanz zu verwenden, um weitere aus tRNA stammende RNA-Kataboliten mit relativ einfachen Mitteln (Vergleich der Ausscheidung der untersuchten Substanz im Urin mit derjenigen von t^4A) daraufhin zu überprüfen, ob eine quantitative Ausscheidung im jeweiligen Fall vorliegen könnte. Dieses Vorgehen kann somit einerseits dazu dienen, eine Vorauswahl möglicher tRNA-Umsatzmarker zu treffen, andererseits kann so das Ausmaß einer möglicherweise vorliegenden Verstoffwechselung abgeschätzt werden.

Die in Tabelle 17 (S. 75) dargestellten Ergebnisse zeigen, daß das bei Säugern für cytoplasmatische tRNA spezifische Nucleosid m_2^2G bei 7 verschiedenen Säugern (davon 6 Primaten) im Urin weitgehend im gleichen Verhältnis zu t^4A gefunden wird, das durchschnittlich für cytoplasmatische tRNA errechnet wurde ($t^4A : m_2^2G$ wie 1 : 2.24; Tab. 1, S. 5).

Beim Menschen spricht das Mengenverhältnis von $t^4A : m_2^2G$ im Urin bei Annahme der beschriebenen quantitativen Ausscheidung von t^4A (Hong et al, 1973) für eine quantitative Ausscheidung auch von m_2^2G (3.1.4.). Wird bei den weiteren untersuchten Primaten gleichfalls quantitative Ausscheidung von t^4A vorausgesetzt, so kann aufgrund der gefundenen $t^4A : m_2^2G$ -Verhältnisse auch für m_2^2G quantitative Ausscheidung abgeleitet werden. Bei Tupaia (die als relativ ursprüngliche bzw. "generalisierte" Säuger angesehen werden) konnte annähernd quantitative Ausscheidung von m_2^2G zusätzlich experimentell (durch intraperitoneale Injektion) bestätigt werden (s. 3.1.8.).

Umgekehrt legt die Übereinstimmung des gefundenen Mengenverhältnisses $t^4A : m_2^2G$ in Tupaia-Urin mit der errechneten durchschnittlichen Ver-

teilung dieser Nucleoside in cytoplasmatischer Säuger-tRNA (Tab. 17, S. 75) nahe, daß auch bei Tupaia's t⁶A quantitativ ausgeschieden wird. Die bisherigen Befunde zur quantitativen Ausscheidung von t⁶A (bei Mensch und Ratte direkt gezeigt von Hong et al, 1973; bei Tupaia's aufgrund des Verhältnisses zu m₂²G erschlossen) lassen es möglich erscheinen, daß t⁶A allgemein bei Säugern quantitativ in Urin ausgeschieden wird.

Aus Tabelle 17 (S. 75) geht weiterhin hervor, daß die Mengenverhältnisse von m¹G + m¹Gua bzw. m²G + m²Gua zu t⁶A im Urin einiger Spezies niedriger liegen, als es der berechneten durchschnittlichen Verteilung in cytoplasmatischer tRNA entspricht, was eine teilweise Verstoffwechselung von m¹G bzw. m²G über die zugehörigen Nucleobasen hinaus vermuten läßt. Dies scheint bei der Ratte besonders stark ausgeprägt zu sein, bei der darüber hinaus als einziger untersuchter Spezies auch m₂²G in deutlich geringerem Mengenverhältnis zu t⁶A ausgeschieden wird, als der Häufigkeit in tRNA entsprechen dürfte (Tab. 17, S. 75). Daher wird m₂²G bei der Ratte im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Säugern wahrscheinlich verstoffwechselt.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine (bei Ratten stark ausgeprägte) allgemeine Tendenz in der Verstoffwechselung von m₂²G < m¹G < m²G (3.1.4.).

Die bisherige Betrachtung der Ausscheidung der hier untersuchten tRNA-Kataboliten beschränkte sich auf einen Vergleich der Verteilung im Urin mit der berechneten Verteilung der entsprechenden Bausteine in cytoplasmatischer Säuger-tRNA. Wie groß der aus dem Umsatz von mitochondrialer tRNA stammende Anteil modifizierter RNA-Bausteine an der insgesamt ausgeschiedenen Menge an tRNA-Kataboliten ist, läßt sich bisher nicht sicher beurteilen. Es gibt allerdings Befunde, die darauf hindeuten, daß dieser Anteil nicht sehr bedeutend sein dürfte.

So kommt das modifizierte Nucleosid m₂²G in den bisher beschriebenen Sequenzen von mitochondrialer tRNA tierischer Herkunft bis auf zwei Ausnahmen nicht vor (Tetrahymena tRNA^{ph} und tRNA^{tyr}; die entsprechende tRNA^{ph} aus Rattenhepatom enthält allerdings kein m₂²G, für tRNA^{tyr} wurden noch keine Sequenzanalysen von höheren Tieren beschrieben;

Sprinzel et al, 1987). Andererseits dürfte t⁴A in mitochondrialer-tRNA ähnlich häufig sein wie in cytoplasmatischer tRNA (Tab. 1, S. 5; Sprinzel et al, 1987; Sander et al, in Vorbereitung). Falls bei den untersuchten Spezies ein bedeutender Anteil an t⁴A aus dem Abbau mitochondrialer tRNA stammen sollte, so müßte, da bei diesen Tieren in mitochondrialer tRNA wahrscheinlich kein m₂²G vorkommt, das im Urin gefundene Mengenverhältnis von m₂²G : t⁴A kleiner sein, als es dem durchschnittlichen Verhältnis von 2.24 : 1 in cytoplasmatischer tRNA entspricht (vgl. Tab. 17, S. 75). Mit Ausnahme von Ratten-Urin ist aber in keinem der untersuchten Urine ein m₂²G : t⁴A-Verhältnis zu beobachten, das auffällig kleiner wäre als das für cytoplasmatische tRNA berechnete durchschnittliche Verhältnis (3.1.4.). Der aus dem Abbau von mitochondrialer tRNA stammende Anteil an der insgesamt ausgeschiedenen t⁴A-Menge dürfte daher nicht erheblich sein. Dementsprechend sollte generell der Beitrag aus mitochondrialer tRNA zur Gesamtausscheidung von tRNA-Kataboliten nicht stark ins Gewicht fallen.

Die im Urin untersuchten tRNA-Kataboliten stammen wahrscheinlich ausschließlich oder doch zumindest überwiegend aus dem endogenen tRNA-Abbau und nicht aus der Nahrung. So konnten Hong et al (1973) zeigen, daß oral an Mensch und Ratte verabreichtes t⁴A praktisch nicht (~5 % bei der Ratte, ~1 % beim Menschen) im Urin ausgeschieden wird. Schöch et al (1983) verabreichten zwei Kindern über 5 Tage eine nucleinsäurenarme bzw. nucleinsäurenreiche Kost. Dabei ergab sich kein wesentlicher Unterschied in der mittleren Ausscheidung von m₂²G und m²G + m²Gua im Vergleich zur mittleren Ausscheidung dieser RNA-Kataboliten bei normaler Kost. Nur im Falle von m¹G + m¹Gua zeigte sich bei Ernährung mit nucleinsäurenarmer Kost eine Abnahme von 35 - 40 %. Eine erhöhte Ausscheidung dieser RNA-Kataboliten bei Gabe von nucleinsäurenreicher Kost wurde allerdings nicht beobachtet.

4.2. Ausscheidung modifizierter rRNA-Kataboliten: Vergleich mit der durchschnittlichen Verteilung in cytoplasmatischer rRNA

Das bisher nach Sander et al (1986b) angewendete Verfahren zur Berechnung von Ganzkörper-rRNA-Umsätzen beruhte darauf, daß der aus dem Abbau von tRNA stammende Ψ -Anteil von der Gesamtausscheidung an Ψ ab-

gezogen und das restliche Ψ dem Abbau von rRNA zugeordnet wurde (3.1.5.). Obwohl Ψ auch in URNAs vorkommt (Tab. 3, S. 10; Busch et al, 1982; Reddy, 1986), dürfte der aus dem Abbau von URNAs stammende Ψ -Anteil im Urin im Verhältnis zu den Anteilen aus tRNA und rRNA sehr gering sein (3.1.6.).

Die in Tabelle 19 (S. 78) dargestellten Ergebnisse machen deutlich, daß sich bei den vier untersuchten Gattungen Ratte, Tupaia, Saguinus und Pavian der dem Abbau von rRNA zuzuordnende Ψ -Anteil zu dem rRNA-spezifischen Nucleosid m^3U im Urin weitgehend so verhält, wie es dem durchschnittlichen Mengenverhältnis dieser beiden Nucleoside zueinander in cytoplasmatischer Säuger-rRNA entspricht.

Daraus ist zu folgern, daß m^3U ebenso wie Ψ (Weissman et al, 1962) bei der Ratte quantitativ ausgeschieden wird; das gleiche dürfte für m^3U und Ψ bei Saguinus, Pavian und Tupaia gelten. Eine annähernd quantitative Ausscheidung von m^3U und Ψ konnte bei Tupaias darüber hinaus nach Injektion direkt bestätigt werden (3.1.8.).

Diese Ergebnisse lassen es sinnvoll erscheinen, ausgeschiedenes m^3U zukünftig als spezifischen Marker zur Schätzung von Ganzkörper-Umsätzen von cytoplasmatischer Säuger-rRNA zu verwenden. Sie bestätigen die Richtigkeit des von Sander et al (1986b) und Schöch et al (1988a) vorgeschlagenen indirekten Berechnungsverfahrens zur Bestimmung von Ganzkörper-rRNA-Umsätzen.

Es ist wahrscheinlich, daß sowohl das direkt bestimmte m^3U als auch der auf den Abbau von rRNA entfallende Ψ -Anteil im Urin fast ausschließlich aus cytoplasmatischer rRNA stammen (aus URNA dürften nur etwa 2 % der ausgeschiedenen Ψ -Menge stammen; Schöch et al, 1988a); denn weder Ψ noch m^3U wurden in mitochondrialer rRNA aus Hamster-BHK-Zellen gefunden (Dubin & Taylor, 1978; Dubin et al, 1978). Obwohl oral zugeführtes Ψ beim Menschen vom Darm anscheinend fast vollständig resorbiert werden kann (Dugaiczky & Eiler, 1966), zeigen die Versuche von Schöch et al (1983), bei denen kein wesentlicher Einfluß von nucleinsäurenreicher bzw. nucleinsäurenarmer Kost auf die Ausscheidung von Ψ gefunden wurde, daß unter normalen Bedingungen vernachlässigbar wenig Ψ aus der Nahrung aufgenommen werden dürfte. Über eine mögliche

Aufnahme von m^3U durch den Darm liegen bisher keine Befunde vor. Sollte diese jedoch unter normalen Bedingungen wesentlich sein, so wäre allerdings ein kleineres $\Psi_{rRNA} : m^3U$ -Verhältnis im Urin zu erwarten als tatsächlich gefunden wurde (Tab. 19, S. 78).

4.3. Vergleich der Verteilung einiger modifizierter RNA-Bausteine in RNA einer "idealisierten Säugerzelle" mit der Verteilung dieser Bausteine in Urin

Für die quantitative Verteilung einzelner RNA-Klassen in einer typischen Säuger-Zelle sind bei Alberts et al (1983) folgende Werte angegeben: 71 % rRNA, ~15 % tRNA, 3 % mRNA und 11 % Vorläufer-RNA-Moleküle. Diese Werte stammten aus Analysendaten von Mäuse-L-Zellen. Schöch et al (1988a) berechneten eine ähnliche durchschnittliche Verteilung von rRNA (285 + 185 + 5.85 + 55) und tRNA für eine idealisierte Säugerzelle, indem sie die Mittelwerte der prozentualen Verhältnisse von rRNA und tRNA aus 7 verschiedenen Geweben der Ratte (Gunning et al, 1981) bildeten. Die so berechneten Mittelwerte betragen 76 % rRNA und 20 % tRNA pro Zelle, wobei Vorläufer-RNAs nicht berücksichtigt wurden. Damit ergibt sich ein mittleres molares Verhältnis von tRNA : rRNA pro durchschnittlicher Säugerzelle von 23.5 : 1 (Sander et al, 1986a; Schöch et al, 1988a). Dieses berechnete Verhältnis von tRNA : rRNA für eine "idealisierte Säugerzelle" wurde als stellvertretend für die durchschnittliche Verteilung von tRNA : rRNA im gesamten Säugerorganismus betrachtet (Schöch et al, 1988a).

Wegen der jeweils ähnlichen Halbwertszeiten von tRNA und rRNA in verschiedenen Geweben der Ratte (Hanoune & Agarwal, 1970; Warner, 1974; Mays, 1983; vgl. 3.1.6.) kann erwartet werden, daß modifizierte RNA-Bausteine annähernd in dem Verhältnis aus tRNA und rRNA freigesetzt werden, wie es ihrer Verteilung in diesen beiden RNA-Klassen in der idealisierten Säugerzelle (und somit durchschnittlich im Gesamtorganismus) entspricht (Tab. 20, S. 79).

Dieses Modell der idealisierten Säugerzelle wurde durch einen Vergleich der erwarteten Ausscheidung von Ψ , m^2G und t^6A sowie der gefundenen Verteilung dieser Nucleoside im Urin von 8 verschiedenen Säu-

ger-Gattungen überprüft (3.1.6.). In den untersuchten Primaten-Urinen lag sowohl das Mengenverhältnis von $m_2^2G : \Psi$ als auch dasjenige von $t^4A : \Psi$ durchschnittlich um 30 % niedriger als die entsprechenden für die idealisierte Säugerzelle ermittelten Werte (Tab. 21, S. 81). Dagegen waren die Schwankungen dieser Verhältnisse im Urin zwischen den verschiedenen Primaten relativ gering (Variationskoeffizient $\sim 15\%$). Diese Ähnlichkeit deutet darauf hin, daß bei Primaten rRNA und tRNA im Ganzkörper in ähnlichen Proportionen abgebaut werden.

Die im Primaten-Urin im Vergleich zum Modell kleineren Mengenverhältnisse von $m_2^2G : \Psi$ bzw. $t^4A : \Psi$ könnten darauf zurückzuführen sein, daß das durchschnittliche Verhältnis von tRNA : rRNA für den Gesamtorganismus niedriger liegt als das für die idealisierte Zelle berechnete (tRNA : rRNA wie 23.5 : 1) und/oder daß rRNA im Gesamtorganismus eine durchschnittlich kürzere Halbwertszeit als tRNA aufweist. Weiterhin dürfte der Beitrag einzelner Organe mit jeweils unterschiedlichem tRNA : rRNA-Verhältnis für die relativen Ausscheidungswerte von m_2^2G , t^4A und Ψ eine Rolle spielen.

Insgesamt aber stützen diese Ergebnisse die prinzipielle Richtigkeit des Modells der idealisierten Säugerzelle (Sander et al, 1986 a,b; Schöch et al, 1988a).

Bestätigung findet das Modell auch durch das Mengenverhältnis von $t^4A : \Psi$ im Urin der Ratte, von der dieses Modell ursprünglich abgeleitet wurde (Tab. 21, S. 81).

Die im Urin von Tupaia's gefundenen Mengenverhältnisse von $m_2^2G : \Psi$ bzw. $t^4A : \Psi$ sind auffallend niedriger als die Mittelwerte der entsprechenden Verhältnisse bei Primaten und auch niedriger als das Verhältnis von $t^4A : \Psi$ bei der Ratte, obwohl gerade bei Tupaia's Befunde für eine quantitative Ausscheidung von m_2^2G , t^4A und Ψ vorliegen (3.1.4., 3.1.5., 3.1.8.). Dies läßt vermuten, daß bei dieser Spezies die Proportionen zwischen dem Abbau von rRNA und tRNA im Gesamtorganismus anders sind als bei Primaten und bei der Ratte. Wie an späterer Stelle (S. 136-137) noch erläutert wird, weisen Tupaia's auch auffallend niedrige absolute Ganzkörper-Umsätze von tRNA und rRNA auf (Schöch et al, 1988a).

4.4. Herkunft von 7-Methylguanin im Urin

Sander et al (1986a,b) fanden in Human-Urin mehr m⁷Gua, als aus dem mit Hilfe der m²G- bzw. Ψ -Ausscheidung ermittelten Abbau von tRNA und rRNA abzuleiten war. Dieses "restliche" m⁷Gua, das im Urin sowohl von Frühgeborenen als auch von Erwachsenen etwa 75 % des insgesamt ausgeschiedenen m⁷Gua ausmacht (Tab. 23, S. 86), dürfte aus dem Abbau von mRNA stammen und wurde als Umsatzmarker für den Ganzkörper-Umsatz von mRNA beim Menschen verwendet (Sander et al, 1986b; Schöch et al, 1988a).

Das Prinzip des Berechnungsverfahrens zur Ermittlung des m⁷Gua-Anteils aus mRNA ist unter 3.1.7. ausführlich erläutert. Es beruht auf Differenzbildung: $m^7Gua_{mRNA} = m^7Gua_{gesamt} - (m^7Gua_{tRNA} + m^7Gua_{rRNA})$.

Ein auf diese Weise berechneter m⁷Gua-Anteil aus mRNA wurde in allen untersuchten Säuger-Urien gefunden (Tab. 23, S. 86). Er betrug in der Regel etwa 50 - 75 % des insgesamt ausgeschiedenen m⁷Gua. Die Ergebnisse waren unabhängig davon, ob für die Berechnung dieses m⁷Gua-Anteils die jeweilige m²G- und Ψ -Ausscheidung oder die t⁶A- und Ψ -Ausscheidung zugrunde gelegt wurde (Ausnahme: die Ratte. Da bei ihr m²G offensichtlich verstoffwechselt wird, 3.1.4., muß die Berechnung auf t⁶A und Ψ aufbauen).

Der wahrscheinlich aus dem Abbau von mRNA stammende m⁷Gua-Anteil dürfte für die meisten hier untersuchten Spezies als ein unterer Grenzwert aufzufassen sein. Denn während m⁷Gua bei der Ratte quantitativ (~95 %) ausgeschieden wird (Craddock et al, 1968), wird beim Menschen nach älteren Literaturangaben eine Oxidation von m⁷Gua zu rund 40 % durch eine Xanthin-Oxidase zu 8-Hydroxy-7-methylguanin diskutiert (Litwack & Weissmann, 1966; Skupp & Ayvazian, 1969). Eine eventuelle zusätzliche Ausscheidung geringer Mengen des Nucleosids m⁷G im Urin einiger untersuchter Arten kann nicht ausgeschlossen werden, da eine saubere Trennung von m⁷G aus Urin mittels HPLC nicht erreicht wurde, ist aber aufgrund vorliegender Erkenntnisse nicht wahrscheinlich. So wurde m⁷G in Human-Urin nicht gefunden (Mrochek et al, 1974). Es wird in Human-Serum schnell (< 5 min) in die entsprechende Nucleobase m⁷Gua umgewandelt (3.2.2.; Tab. 28, S. 108). In vitro-Versuche mit Purin-Nucleosid-

Phosphorylase aus Kälbermilz zeigten, daß m^7G in einer unter den verwendeten Bedingungen irreversiblen Reaktion in m^7Gua umgewandelt wird (Kulikowska et al, 1986).

Bei den aus tRNA stammenden Kataboliten m^2G und t^4A , läßt sich aus deren Verhältnis zueinander im Urin verglichen mit der berechneten durchschnittlichen Verteilung in cytoplasmatischer Säuger-tRNA (3.1.4.) eine weitgehend quantitative Ausscheidung beider modifizierter Nucleoside bei den untersuchten Spezies (außer bei der Ratte) ableiten. Auch das Mengenverhältnis von $\psi_{tRNA} : m^3U$ im Urin, entspricht weitgehend der Verteilung dieser Nucleoside in cytoplasmatischer Säuger-rRNA (3.1.5.). Dagegen läßt sich kein weiteres aus mRNA stammendes modifiziertes Nucleosid finden, das mit dem berechneten m^7Gua -Anteil aus mRNA im Urin in Beziehung gesetzt werden könnte. Zwar kommen in cytoplasmatischer mRNA durchschnittlich 1-2 Reste m^6A vor (Moss, 1984; Flint, 1984), doch wird m^6A in Human-Urin im Gegensatz zur Erwartung allenfalls in Spuren ausgeschieden (Uziel et al, 1976; Gehrke & Kuo, 1985; Schöch et al, 1988a), was wahrscheinlich auf eine Verstoffwechselung von m^6A zurückzuführen ist. Die entsprechende Nucleobase m^6Ade wurde im Human-Urin ebenfalls nicht gefunden (eigene nicht dargestellte Ergebnisse).

Das im Urin ausgeschiedene m^7Gua sollte weitgehend aus dem endogenen RNA-Abbau stammen. Zwar kann durch eine Magensonde zugeführtes m^7Gua von der Ratte resorbiert und im Urin ausgeschieden werden (Craddock et al, 1968), eine signifikante Änderung in der m^7Gua -Ausscheidung im Vergleich zur Normalausscheidung wurde aber beim Menschen weder bei Gabe einer purinarmen, fleischfreien Diät noch bei einer reinen Glucose-Diät noch nach Reduzierung der Darmflora durch Verabreichung von Antibiotica beobachtet (Weissmann et al, 1957b). Auch Schöch et al (1983) fanden bei zwei Kindern, die mit nucleinsäurenreicher bzw. nucleinsäurenarmer Kost jeweils 5 Tage lang ernährt wurden, keinen signifikanten Unterschied in der Ausscheidung von m^7Gua .

Weiterhin dürfte das im Urin ausgeschiedene m^7Gua aus dem Abbau cytoplasmatischer RNA stammen, denn weder wurden Cap-Stukturen in mitochondrialer mRNA gefunden (Moss, 1984), noch konnte m^7G in mitochondrialer rRNA aus Hamster-Zellen (Dubin et al, 1978; Dubin & Taylor,

1978) bzw. in bisher sequenzierten mitochondrialen tRNAs tierischer Herkunft identifiziert werden (Sprinzl et al, 1987).

4.5. Weitgehend quantitative Ausscheidung von Pseudouridin, 3-Methyluridin und N²,N²-Dimethylguanosin nach i.p. Gabe bei Tupaia

Die im Urin von Säugern beobachteten Mengenverhältnisse von m²G zu t⁶A bzw. von m³U zu dem berechneten Ψ -Anteil aus rRNA machten es wahrscheinlich, daß sowohl m²G als auch m³U bei den daraufhin untersuchten Spezies in der Regel weitgehend unverstoffwechselt ausgeschieden werden (4.1.; 4.2.). Eine Ausnahme bildet lediglich m²G bei der Ratte (3.1.4.), das bei dieser Spezies offensichtlich in erheblichem Umfang verstoffwechselt wird.

Eine direkte Überprüfung der vermuteten quantitativen Ausscheidung erfolgte durch i.p. Gabe von m³U und m²G bei Tupaia. Dabei wurde zusätzlich untersucht, ob injiziertes Ψ auch von Tupaia (wie für Mensch und Ratte beschrieben; Weissman et al, 1962; Dugaiczky & Eiler, 1966) quantitativ im Urin ausgeschieden wird.

Die Ergebnisse einer Reihe von i.p. Injektionsversuchen sprechen für weitgehend quantitative Ausscheidung von Ψ , m³U und m²G sowie indirekt (aufgrund des Mengenverhältnisses von t⁶A : m²G im Urin) auch von t⁶A bei Tupaia (3.1.8.; 3.1.4.).

Ursachen für eine in zwei Fällen beobachtete stark erhöhte Ausscheidung auch nicht injizierter Verbindungen (Abb. 25 u. 26, S. 91 u. 93) bei der kombinierten Injektion von methylierten Nucleosiden sind unklar. Dieses Phänomen wurde weder bei den Ψ -Injektionsversuchen (Abb. 23 u. 24, S. 88 u. 89) noch bei den Kontrollen, bei denen Lösungsmittel i.p. injiziert wurde (Abb. 28, S. 96), beobachtet. Allerdings ist nicht auszuschließen, daß bei Tupaia D (Abb. 26, S. 93) die über 3 Tage gemittelte Basisausscheidung aufgrund von Urinverlusten bei der Sammlung zu niedrig bestimmt wurde, da bei dem zweiten Injektionsversuch bei dem gleichen Tier eine höhere Basisausscheidung gemessen wurde (Abb. 27, S. 94).

Ob die relativ niedrigere Wiederfindung von i.p. injiziertem m^1G (im Durchschnitt 65 %; Abb. 25 - 27, S. 91, 93 u. 94) durch eine teilweise Verstoffwechselung und/oder durch teilweise Ausscheidung auf anderem Weg als über die Niere zu erklären ist, kann nicht beurteilt werden. Das im Tupaia-Urin gefundene Mengenverhältnis von m^1G zu t^4A (Tab. 17, S. 75) läßt bei diesen Tieren unter physiologischen Bedingungen eher eine quantitative Ausscheidung von m^1G vermuten.

Aufgrund des im Tupaia-Urin vorliegenden Verhältnisses von (m^2G + m^2Gua) zu t^4A (Tab. 17, S. 75) kann ebenfalls auf eine quantitative Ausscheidung von m^2G + m^2Gua bei Tupaia unter physiologischen Bedingungen geschlossen werden. Darüber, ob auch hier die relativ niedrige Wiederfindung von i.p. injiziertem m^2G (Abb. 25 u. 26, S. 91 u. 93) von durchschnittlich 28 % ($n = 2$) auf eine tatsächliche Verstoffwechselung und/oder einen anderen Ausscheidungsweg als über Urin zurückzuführen ist, kann nur spekuliert werden, zumal nicht sicher ist, ob das im Injektionsansatz eingesetzte m^2G wegen seiner schlechten Löslichkeit überhaupt quantitativ injiziert wurde.

Die in einigen i.p. Injektionsversuchen allgemein niedrigeren Wiederfindungsraten von injizierten Substanzen (3.1.8.) könnten durch Urinverluste bei der Sammlung bedingt sein. Bei den Tupaia, bei denen hohe Wiederfindung injizierter Nucleoside gemessen wurde, befanden sich ~ 75 % (m^3U bzw. m^2G) der innerhalb von 24 h nach der Injektion ausgeschiedenen Mengen im Morgen-Urin. Das bedeutet, daß die am Vorabend um 20.00 Uhr injizierten Verbindungen weitgehend bereits am nächsten Morgen um 8.00 Uhr im Urin vorlagen. Da die am Morgen im Urin gefundenen Mengen injizierter Nucleoside die Summe der über 12 h in der Nacht in die Blase ausgeschiedenen Mengen bildeten, können keine Aussagen darüber gemacht werden, in welchem engeren Zeitraum innerhalb der 12 h-Nachtperiode sich der Großteil der injizierten Nucleoside in der Blase ansammelte. Denkbar wäre es, daß bereits zu einem verhältnismäßig frühen Zeitpunkt eine hohe Konzentration in einem relativ kleinen Urinvolumen in der Blase vorlag. Wäre ein Teil davon in einigen Fällen unbeobachtet abgegeben worden, so könnte dies niedrige Wiederfindungsraten aller injizierten Nucleoside erklären. Zwar wird allgemein angenommen, daß die Tiere während der Nacht ruhen, dies kann aber durchaus nicht

für alle verwendeten Tiere mit Sicherheit behauptet werden. Der eventuell in der Nacht verlorengegangene Urin muß nicht durch eine auffällige Abnahme bei den nicht injizierten Verbindungen erkennbar sein, da die normale Schwankung der gemessenen Tagesausscheidung sich oft im Bereich von 20 % - 30 % bewegt. Sollten z.B. zu einem frühen Zeitpunkt auch nur 20 % des insgesamt während der Nachtperiode gebildeten Urins verlorengegangen sein, so hätten sich für die nicht injizierten Verbindungen Ausscheidungswerte ergeben, die noch im Bereich der normalen Schwankungen gelegen hätten, obwohl der verlorene Urinanteil mutmaßlich einen Großteil der injizierten Nucleoside enthalten hätte.

Es besteht auch die Möglichkeit, daß bei einigen Tupaia jeden Tag ein geringer Teil des Urins bei der Sammlung nicht erfaßt wurde. Das würde bedeuten, daß die gemessene Ausscheidung nicht injizierter Verbindungen jeden Tag etwas zu niedrig läge. Wäre dieser Verlust innerhalb der 24 h nach Injektion gleich groß wie im Durchschnitt, so würden die ausgeschiedenen Mengen nicht injizierter Verbindungen innerhalb dieses Zeitraumes nicht von der gemessenen mittleren Ausscheidung abweichen. Für die injizierten Verbindungen könnte das aber bedeuten, daß gerade in dem Urinanteil, der innerhalb von 24 h nach der Injektion möglicherweise verlorengegangen war, ein Großteil der injizierten authentischen Verbindungen enthalten gewesen sein könnte.

4.6. Verstoffwechselung modifizierter Ribonucleoside und modifizierter Nucleobasen in Gewebeeextrakten

Die aufgrund der Urin-Daten für einige der untersuchten Säuger und insbesondere die Ratte postulierte Verstoffwechselung von m^1G und m^2G über die entsprechenden Nucleobasen hinaus (3.1.4.; 4.1.) wurde durch Inkubation von m^1G und m^1Gua bzw. m^2G und m^2Gua mit postribosomalem Überstand aus Rattenleber in vitro bestätigt (3.3.1.).

Allerdings konnte die bei der Ratte im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Säugern in vivo sehr wahrscheinlich stattfindende Verstoffwechselung von m^2_2G (3.1.4.) durch Inkubationsversuche mit postribosomalem Überstand aus Leber in vitro nicht nachvollzogen werden (Abb. 34,

S. 110). Auch eine Inkubation von m_2^2G mit Rohhomogenaten aus Leber, Niere und Milz führte zu keiner deutlichen Verstoffwechselung (Abb. 35, S. 113). Dies könnte auf suboptimale Reaktionsbedingungen zurückzuführen sein. Denkbar ist ferner ein Abbau von m_2^2G bei der Ratte im Plasma (noch nicht geprüft). Das Ausmaß der Abnahme von $m^2G > m^1G > m_2^2G$ in vitro (Abb. 34, S. 110) spiegelt immerhin die aufgrund der Mengenverhältnisse dieser modifizierten Nucleoside zu t^4A im Ratten-Urin postulierte Intensität der Verstoffwechselung in vivo $m^2G > m^1G > m_2^2G$ (3.1.4.; 4.1.) wider.

Diese Ergebnisse verdeutlichen einen entscheidenden Vorteil des Verfahrens, aus vergleichenden Messungen im Urin auf mögliche Verstoffwechselung eines RNA-Kataboliten zu schließen (Sander et al, 1986a; Schöch et al, 1988a). Mit diesem Vorgehen ist es nämlich möglich, eine in vitro (wie bisher im oben diskutierten Fall von m_2^2G bei der Ratte) evtl. nicht erkennbare tatsächliche Verstoffwechselung in vivo durch den Bezug eines ausgeschiedenen Kataboliten auf eine quantitativ ausgeschiedene Standardsubstanz (hier z. B. t^4A) zu erkennen, sofern die Stöchiometrie des betreffenden Kataboliten sowie der Standardsubstanz innerhalb der zugehörigen Herkunfts-RNA-Klassen (hier tRNA) mit hinreichender Sicherheit bekannt ist.

Die modifizierten Nucleobasen m^1Gua und m^2Gua wurden weder als Ausscheidungsprodukte in Ratten-Urin (Tab. 14, S. 69) noch als Folgeprodukte bei der Inkubation von m^1G und m^2G mit postribosomalem Überstand aus Rattenleber gefunden. Tatsächlich wurden auch m^1Gua und m^2Gua bei Inkubation mit zellfreiem Gewebeextrakt aus Rattenleber vollständig eliminiert (Tab. 29, S. 112).

Da einige Säuger auch die Nucleobasen m^1Gua und m^2Gua ausscheiden (Tab. 14, S. 69), erscheint es möglich, daß m^1G und m^2G z.B. durch Purin-Nucleosid-Phosphorylase in die entsprechenden Nucleobasen umgewandelt werden. Für m^2G konnte eine derartige Überführung in m^2Gua durch eine Purin-Nucleosid-Phosphorylase aus Kälbermilz gezeigt werden (Kulikowska et al, 1986). Somit läßt sich folgender möglicher Abbauweg bei der Ratte formulieren: die modifizierten Nucleoside m^1G und m^2G könnten durch eine Purin-Nucleosid-Phosphorylase in m^1Gua und m^2Gua überführt

werden. Die entstandenen modifizierten Nucleobasen würden dann schnell weiter verstoffwechselt, so daß sie als Abbauprodukte im Urin nicht ausgeschieden werden. Über die weitere Verstoffwechselung von $m^1\text{Gua}$ und $m^2\text{Gua}$ kann nur spekuliert werden. So beschrieben Hitchings & Falco (1944) nach Inkubation von $m^1\text{Gua}$ mit einem Guanase-Präparat aus Kaninchenleber eine Desaminierung von rund 10 % derjenigen des eigentlichen Substrats Guanin. Eine schwache Verstoffwechselung von $m^2\text{Gua}$ bei Inkubation mit einer Kuhmilch-Xanthin-Oxidase (200-fach langsamer als die Oxidation von Hypoxanthin), beschrieben Weissmann & Gutman (1957a).

Die in Tupaia-Urin vorliegenden Mengenverhältnisse von $m^1\text{G}$ und $m^2\text{G}$ + $m^2\text{Gua}$ zu $t^4\text{A}$ (Tab. 17, S. 75) machen es wahrscheinlich, daß diese methylierten Guaninderivate bei Tupaia nicht in größerem Ausmaß verstoffwechselt werden (3.1.4.). Tatsächlich wurde bei Inkubation authentischer Nucleoside mit zellfreiem Überstand aus Tupaialeber keine Abnahme von $m^1\text{G}$ und $m^2\text{G}$ gefunden (Tab. 30, S. 115). Allerdings wäre eine Abnahme von $m^2\text{G}$ zu erwarten gewesen, da in vivo die entsprechende Nucleobase $m^2\text{Gua}$ ausgeschieden wird. Dieses Ergebnis könnte (wie das Ausbleiben einer Verstoffwechselung von $m^2_2\text{G}$ im RattenLeberextrakt) auf suboptimale in vitro-Reaktionsbedingungen zurückzuführen sein. Neben Leber müßten auch noch weitere Organe sowie Plasma untersucht werden. Trotzdem zeigt ein Vergleich der mit RattenLeber- bzw. Tupaialeberextrakt gewonnenen Ergebnisse eindeutige Unterschiede in der Verstoffwechselung von $m^1\text{G}$ und $m^2\text{G}$ bei diesen beiden Spezies. Sie stützen aus Urindaten abgeleitete Befunde, wonach $m^1\text{G}$ und $m^2\text{G}$ wohl bei der Ratte in großem Ausmaß über die zugehörigen Nucleobasen hinaus, nicht aber bei Tupaia (bis auf eine Abspaltung der Ribose beim $m^2\text{G}$) verstoffwechselt werden (3.1.4.). Die im zellfreien Überstand aus Tupaialeber gemessene Abnahme von zugesetztem G (Tab. 30, S. 115) bzw. endogenem A (Tab. 31, S. 116) sowie die Zunahme von endogenem I (Tab. 31) während der Inkubation bestätigt, daß Enzymaktivität im Leberextrakt vorhanden war.

Auch eine Verstoffwechselung von $m^2_2\text{G}$ und $m^2\text{U}$ bei Tupaia, die schon aufgrund der im Urin gefundenen Verteilung (3.1.4. u. 3.1.5.) sowie aufgrund der Ergebnisse der Injektionsversuche (3.1.8.) nicht wahrscheinlich war, konnte bei Inkubation dieser Nucleoside mit Leberextrakt nicht beobachtet werden.

Überraschenderweise kann $m^1\text{Gua}$ in Tupaialeberextrakt offenbar verstoffwechselt werden (Tab. 32, S. 117), obgleich fraglich ist, ob $m^1\text{Gua}$ von Tupaia in vivo gebildet wird, denn die Verteilung von $m^1\text{G}$ zu $t^4\text{A}$ im Urin (Tab. 17, S. 75) macht eine quantitative Ausscheidung des Nucleosids $m^1\text{G}$ bei Tupaia wahrscheinlich. Überraschend ist auch der Befund, daß $m^2\text{Gua}$ im Tupaialeberextrakt teilweise eliminiert wird (Tab. 32, S. 117). Zwar ist die Abnahme von $m^2\text{Gua}$ im Tupaialeberextrakt mit -30 % im Vergleich zu derjenigen in Rattenleberextrakt (-100 %) geringer, doch läßt das Mengenverhältnis zu $t^4\text{A}$ im Tupaia-Urin eher eine quantitative Ausscheidung von $m^2\text{G} + m^2\text{Gua}$ bei Tupaia vermuten (3.1.4.).

4.7. Modifizierte RNA-Kataboliten in Serum und Plasma

Die Messung der zur Bestimmung von tRNA-, rRNA- und mRNA-Ganzkörperumsätzen verwendeten RNA-Kataboliten $m^2_2\text{G}$, Ψ und $m^7\text{Gua}$ (Sander et al, 1986b; Schöch et al, 1988a) im Serum von Erwachsenen ergab, daß individuelle Konzentrationsschwankungen dieser RNA-Kataboliten bemerkenswert gering sind (Tab. 25, S. 104; Topp et al, 1985 und 1987). Die im Serum bestimmten Konzentrationen waren außerdem den Werten der stichprobenartigen Bestimmungen in Plasma sehr ähnlich (Tab. 26, S. 105), so daß während der Blutgerinnung bei der Serum-Herstellung keine größeren Konzentrationsänderungen stattgefunden haben.

Es kann somit für die mittleren Konzentrationen von $\Psi : m^7\text{Gua} : m^2_2\text{G}$ im Serum Erwachsener ein Verhältnis angegeben werden, das (auf $\Psi = 100$ normiert) $100 : 4.7 : 1.1$ beträgt (Tab. 25, S. 104). Ein Vergleich dieses Verhältnisses mit der im Urin Erwachsener vorliegenden recht konstanten entsprechenden Verteilung von $100 : 19 : 5.7$ (Tab. 25, S. 104), zeigt deutliche Unterschiede. Diese könnten auf verschiedene renale Ausscheidungsmechanismen für die hier betrachteten RNA-Kataboliten zurückzuführen sein.

Zur Beurteilung der Frage, welche renale Ausscheidungsmechanismen für eine Substanz vorliegen könnten, eignet sich Kreatinin als Vergleichssubstanz, da dieses praktisch ausschließlich über glomeruläre Filtra-

tion ausgeschieden wird (Bjornsson, 1979). Der Ψ /Kreatinin-Quotient im Serum liegt 1.6-fach höher als im Urin, der $m^7\text{Gua}$ /Kreatinin- bzw. $m^2_2\text{G}$ /Kreatinin-Quotient dagegen 0.4- bzw. 0.3-fach niedriger (Tab. 25, S. 104; Topp et al, 1987). Das könnte bedeuten, daß Ψ , vollständige Filtration vorausgesetzt, in der Niere teilweise rückresorbiert wird, und daß für $m^7\text{Gua}$ und $m^2_2\text{G}$ eine Nettosekretion vorliegt. Auch die mittels der gemessenen Serumkonzentrationen und der durchschnittlichen Tagesausscheidung von Ψ , $m^7\text{Gua}$, $m^2_2\text{G}$ und Kreatinin bei Erwachsenen (Sander et al, 1986b) errechneten Clearance-Werte von 95 ml/min (Ψ), 380 ml/min ($m^7\text{Gua}$), 500 ml/min ($m^2_2\text{G}$) im Vergleich zum Kreatinin-Clearance-Wert von 150 ml/min (Schöch et al, 1988a) weisen in die gleiche Richtung. Wenn anstelle des etwas hohen Kreatinin-Clearance-Wertes von 150 ml/min ein bei insgesamt 1000 Personen ermittelter durchschnittlicher Kreatinin-Clearance-Wert von rund 115 ml/min (Arab et al, 1982) zum Vergleich herangezogen wird, ergibt sich für Ψ immer noch eine, wenn auch geringere Rückresorption. Für $m^7\text{Gua}$ bzw. $m^2_2\text{G}$ resultiert unter dieser Annahme eine noch höhere Nettosekretion.

Der Einhaltung niedriger Konzentrationen für einige RNA-Kataboliten in Körperflüssigkeiten könnte eine physiologische Bedeutung zukommen. So zeigte Kerr (1985a), daß sich C3H/10T1/2-Mäuse-Fibroblasten bei 1 μM $m^7\text{Gua}$ im Medium zu Adipozyten differenzieren und daß bei Inkubation von Hamster-Embryozellen mit 10 μM $m^7\text{Gua}$ kontinuierliche Zell-Linien entstehen (Trewyn & Kerr, 1978; Kerr, 1985b).

Die gemessenen Serumkonzentrationen wurden durch Zusatz authentischer Verbindungen zum Serum vor der Enteiweißung Ausbeute-korrigiert (Tab. 24, S. 101; Abb. 32, S. 102). Somit wurde eine eventuelle Bindung der untersuchten RNA-Kataboliten an Serumproteine berücksichtigt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß die gemessenen niedrigen Serum- und Plasma-Konzentrationen auf eine teilweise Adsorption von $m^7\text{Gua}$ und $m^2_2\text{G}$ an Blutzellen zurückzuführen sind.

Gehrke & Kuo (1985) beschrieben das Vorkommen von $m^7\text{G}$ in Humanserum. Dieser Befund konnte bei Reinigung von Serum nach der von Gehrke angewandten Methode (Davis et al, 1977) nicht bestätigt werden (3.2.2.). Dagegen wird ein Großteil von zu Serum zugesetztem $m^7\text{G}$ in $m^7\text{Gua}$ umge-

wandelt (Tab. 27 u. 28, S. 106 u. 108). Die Umwandlung vollzieht sich schnell (< 5 min), ihr Ausmaß verändert sich bei längerer Inkubation (60 min) nicht (Tab. 28, S. 108). Diese Ergebnisse bieten eine Erklärung dafür, daß m^7G in Serum allenfalls in Spuren vorkommt. Zudem wird es auch im Human-Urin nicht gefunden (Mrochek et al, 1974). Daß m^7Gua im Serum teilweise zu OH^6m^7Gua oxidiert wird, dürfte unwahrscheinlich sein, denn obwohl beschrieben wurde, daß eine Leber-Xanthin-Oxidase beim Menschen m^7Gua zu OH^6m^7Gua oxidieren kann (Skupp & Ayvazian 1969), sollte eine Xanthin-Oxidase im Serum unter normalen Bedingungen nicht bzw. allenfalls in Spuren vorkommen (Shamma'a et al, 1965).

4.8. Schlußfolgerungen: Grundlagen der Ganzkörper-Umsatzberechnung von tRNA, rRNA und mRNA aus der Ausscheidung modifizierter RNA-Kataboliten

Eine Verstoffwechselung modifizierter Nucleoside bei Säugern in vivo wurde bisher für i^4A (Chheda & Mittelman, 1972; Rustum & Schwartz, 1974) und m^1A nachgewiesen (Dutta & Chheda, 1987). Weiterhin wurde beschrieben, daß die modifizierte Nucleobase m^7Gua beim Menschen zu OH^6m^7Gua oxidiert wird (Litwack & Weissmann, 1966; Skupp & Ayvazian, 1969). Im übrigen ist die Auffassung verbreitet, daß modifizierte RNA-Kataboliten "stabil" seien (Borek et al, 1983; Borek, 1985).

Ein Vergleich der Ausscheidung von RNA-Kataboliten mit der Erwartung, die sich aus ihrer durchschnittlichen Verteilung in cytoplasmatischer RNA ergibt (Schöch et al, 1988a), verdeutlicht aber, daß bei einigen Säugern die methylierten Guaninderivate m^1G und m^2G wahrscheinlich sogar über die zugehörigen modifizierten Nucleobasen hinaus verstoffwechselt werden (3.1.4.). Dies trifft besonders für die Ratte zu, bei der im Gegensatz zu den restlichen untersuchten Säugern die Ausscheidungswerte auch für eine Verstoffwechselung von m^2_2G in vivo sprechen und bei der eine Verstoffwechselung von m^1G und m^2G sowie von m^1Gua und m^2Gua in vitro bestätigt werden konnte (3.3.1.). Da die quantitative Ausscheidung von modifizierten RNA-Kataboliten eine Grundvoraussetzung für die Ableitung von Ganzkörper-RNA-Umsatzraten darstellt, entfällt eine Nutzung von $m^1G + m^1Gua$ sowie von $m^2G + m^2Gua$ (zusätz-

lich von m_2^2G bei der Ratte) für die Bestimmung der Ganzkörperumsätze von tRNA.

Dagegen kann aufgrund der im Urin gefundenen Mengenverhältnisse von m_2^2G : t^6A bei den untersuchten Säugern (Ausnahme: Ratte) eine quantitative Ausscheidung nicht nur für t^6A , sondern auch für m_2^2G abgeleitet werden (Tab. 17, S. 75; 3.1.4.; 4.1.); für m_2^2G wurde dies durch i.p. Injektionsversuche bei Tupaias bestätigt (3.1.8.).

Für die Berechnung von Ganzkörper-tRNA-Umsätzen lassen sich somit künftig unabhängig voneinander zwei tRNA-spezifische Nucleoside (t^6A und m_2^2G) nutzen. Damit ist auch der Nachweis erbracht, daß es weiterhin sinnvoll ist, das kommerziell erhältliche und gut im Urin nachweisbare m_2^2G neben bzw. anstelle von t^6A (Ausnahme: Ratte) als "Schlüsselsubstanz" zur Berechnung des Ψ -Anteils aus dem rRNA-Abbau und hierauf aufbauend auch des vermutlichen m^7Gua -Mindestanteils aus dem mRNA-Abbau in Urin zu verwenden (3.1.5.; 3.1.7.; Sander et al, 1986b; Schöch et al, 1988a).

Die bisherige Berechnung der Ganzkörper-Umsätze von cytoplasmatischer Säuger-rRNA erfolgte indirekt, indem der aus dem tRNA-Abbau stammende Ψ -Anteil vom insgesamt ausgeschiedenen Ψ abgezogen und das restliche Ψ dem Abbau von rRNA zugeordnet wurde (Sander et al, 1986b; Schöch et al, 1988a). Die vorliegenden Ergebnisse (3.1.5.) lassen die Schlußfolgerung zu, daß m^8U bei den daraufhin untersuchten Säugern (Ratte, Tupaias, Saguinus und Pavian) weitgehend unverstoffwechselt ausgeschieden wird, und daß der nach dem bisherigen Verfahren berechnete Ψ_{rRNA} -Anteil im Urin tatsächlich aus dem Abbau von rRNA stammt. Eine annähernd quantitative Ausscheidung von m^8U konnte darüber hinaus durch i.p. Injektion dieser Substanz bei Tupaias bestätigt werden (3.1.8.), so daß in Zukunft Ganzkörper-Umsätze von cytoplasmatischer rRNA über die Ausscheidung des rRNA-spezifischen Nucleosids m^8U direkt bestimmt werden können.

In Tabelle 33 (S. 136) sind Ganzkörper-Abbauraten (in $\mu\text{mol/kg/d}$) von tRNA, rRNA und mRNA-Cap bei Mensch, Tupaias und Ratte dargestellt, die über die m_2^2G -, t^6A -, Ψ - und m^7Gua -Ausscheidung berechnet wurden. Unter

Tabelle 33:

RNA-Abbauraten bei Ratten, Tupaia, Frühgeborenen und Erwachsenen (nach Schöch et al., 1980a)

Spezies	tRNA-Abbau		rRNA-Abbau		mRNA-CAP-Abbau	
	t ⁴ A	berechnet über m ² G	Ψ , ((t ⁴ A))	berechnet über Ψ , (m ² G))	m ² Gua, (Ψ , t ⁴ A))	berechnet über m ² Gua, (Ψ , m ² G))
Ratten	2.33 (5.8)	--	0.21 (4.9)	--	3.30 (4.2)	--
Tupaia	0.56 (1.4)	0.69 (1.2)	0.11 (2.6)	0.11 (3.0)	1.21 (1.5)	1.16 (1.6)
frühgeborene Menschen	1.61 (4.0)	1.75 (3.0)	0.11 (2.6)	0.10 (2.7)	2.82 (3.6)	2.76 (3.9)
erwachsene Menschen	0.40 (1)	0.60 (1)	0.043 (1)	0.037 (1)	0.79 (1)	0.71 (1)

Parameter in (()) werden als Korrekturfaktoren bei Umsatzberechnungen von rRNA und mRNA benötigt.

n.b.: nicht bestimmt. Angegeben sind Durchschnittswerte in $\mu\text{mol/kg Körpergew./d}$. In Klammern sind relative Abbauraten dargestellt (der jeweilige Wert bei Erwachsenen wurde = 1 gesetzt). Die Berechnung des tRNA-Abbaus erfolgte direkt über die t⁴A- bzw. m²G-Ausscheidung im Urin (Tab. 15, S. 71) unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Vorkommens von t⁴A bzw. m²G in cytoplasmatischer tRNA (Tab. 1, S. 5). Die Berechnung des rRNA-Abbaus erfolgte über den wahrscheinlich aus rRNA stammenden Ψ -Anteil im Urin, der sowohl über die t⁴A- als auch über die m²G-Ausscheidung (bei Ratten ausschließlich über die t⁴A-Ausscheidung) ermittelt wurde (vgl. 3.1.5.) und unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Vorkommens von Ψ in cytoplasmatischer rRNA (95 Reste; Tab. 2, S. 8). Darüber hinaus wurde der rRNA-Abbau bei Ratte und Tupaia direkt über die m²U-Ausscheidung (Tab. 18, S. 77) unter Berücksichtigung des Vorkommens von m²U in cytoplasmatischer rRNA (1 Rest; Tab. 2, S. 8) bestimmt. Der mRNA-Cap-Abbau wurde über den wahrscheinlich aus dem Abbau der mRNA stammenden m²Gua-Anteil im Urin ermittelt. Die Berechnung dieses m²Gua-Anteils erfolgte durch Abzug der mittels der t⁴A-, m²G- und Ψ -Ausscheidung berechneten m²Gua-Anteile aus dem Abbau von tRNA und rRNA von der insgesamt ausgeschiedenen m²Gua-Menge (vgl. 3.1.7.; Tab. 22, S. 85). Beim Menschen wurden die ursprünglich auf Kreatinin bezogenen Ausscheidungswerte von Ψ , t⁴A, m²G und m²Gua (5.80; Tab. 15, S. 71; Tab. 22, S. 85) unter Bezug auf eine mittlere Kreatinin-Ausscheidung von 0.093 mmol/d/kg Körpergewicht bei Frühgeborenen und 0.21 mmol/d/kg Körpergewicht bei Erwachsenen (Sander et al., 1986b) zu Tagesausscheidungswerten umgerechnet. Durchschnittliches Körpergewicht der Ratten: 320 $\pm$ 18g; der Tupaia: 215 $\pm$ 25g.

Gleichgewichtsbedingungen sollten diese Werte den Ganzkörper-Umsätzen dieser RNA-Klassen entsprechen. Weiterhin enthält die Tabelle rRNA-Abbauraten bei Tupaia und Ratte, welche mittels der m^3 U-Ausscheidung berechnet wurden.

Die in einfachen Klammern als Vielfache des jeweiligen Wertes von Erwachsenen (= 1) dargestellten RNA-Umsätze machen deutlich, daß die für Frühgeborene ermittelten Ganzkörperumsätze von tRNA, rRNA und mRNA ungefähr 2.5- bis 3.5-fach höher liegen als bei Erwachsenen (Schöch et al, 1988a,b). Um einen ähnlichen Faktor ist der Muskelprotein-, Gesamtprotein- und Grundumsatz bei Frühgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen erhöht (Sander et al, 1986c; Schöch et al, 1988a,b).

Die für Ratten ermittelten Ganzkörper-Umsatzraten von tRNA und rRNA liegen ungefähr 5- bis 6-mal höher als die von erwachsenen Menschen; der Proteinumsatz von Ratten ist etwa 6 mal, ihr Grundumsatz etwa 4.5 mal höher als die entsprechenden Werte bei erwachsenen Menschen (Schöch et al, 1988a).

Es könnte daher ein Zusammenhang zwischen der Intensität des RNA- und Protein-Ganzkörperumsatzes als wichtige Komponenten der allgemeinen Stoffwechselaktivität eines Organismus bestehen (Schöch et al, 1988a).

Allerdings fügen sich die hier mituntersuchten Tupaia nicht ganz in die dargelegten Zusammenhänge. Sie weisen für ihr Körpergewicht (~ 200 g; die verwendeten Ratten wogen durchschnittlich 320 g), überraschend niedrige tRNA- und rRNA-Ganzkörperumsätze auf (Tab. 33; die Interpretation des mRNA-Cap-Umsatzes ist schwierig, da keine Kontrollmöglichkeiten für die zugrundegelegte quantitative Ausscheidung von m^3 Gua bestehen). Dabei liegt der durchschnittliche O_2 -Verbrauch bei Tupaia im Ruhezustand von durchschnittlich 1.2 ml O_2 /g/h (Fuchs & Kleinknecht, 1986), ein Maß für die Stoffwechselintensität, sogar höher als der für Ratten beschriebene O_2 -Verbrauch von durchschnittlich 0.9 ml O_2 /g/h (Penzlin, 1977).

Andererseits zeigen erste Ergebnisse bei Mäusen, die im Vergleich zum erwachsenen Menschen einen etwa 8-fach höheren Grundumsatz aufweisen,

daß die Ψ -Ausscheidung bei dieser Spezies ebenfalls durchschnittlich um den Faktor 8.5 erhöht ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sichern und erweitern die neuen Möglichkeiten einer Berechnung der Ganzkörper-Umsatzraten von tRNA, rRNA und mRNA (Schöch et al, 1988a). Es ist zu hoffen, daß damit künftig auf nichtinvasivem Wege weitere wichtige Einsichten in die Gesetzmäßigkeiten des RNA-Stoffwechsels ermöglicht werden.

5. Zusammenfassung

Es wurden HPLC-Methoden zur Messung von Ψ in verdünntem Nativurin sowie zur Messung von Ψ , m_2^2G , m^7Gua und Kreatinin in ultrafiltriertem Serum entwickelt. Die Methode zur Analyse modifizierter Nucleobasen aus Urin wurde durch Hinzunahme eines externen Standards, 8-Methylisocytosin, und durch Verbesserung der Chromatographie-Bedingungen weiterentwickelt.

Die Verhältnisse der ausgeschiedenen Mengen der modifizierten tRNA-Kataboliten m_2^2G und t^4A zueinander im Urin von 7 verschiedenen Säuger-Spezies (darunter Tupaias sowie 6 Primaten einschließlich Mensch) entsprechen weitgehend dem berechenbaren durchschnittlichen Verhältnis von m_2^2G zu t^4A in cytoplasmatischer tRNA von Säugern. Da für t^4A bei Mensch und Ratte quantitative Ausscheidung beschrieben wurde, machen diese Ergebnisse quantitative Ausscheidung auch von m_2^2G bei den untersuchten Primaten sowie bei Tupaias wahrscheinlich.

Dagegen läßt das im Ratten-Urin bestimmte Mengenverhältnis von m_2^2G zu t^4A auf eine Verstoffwechselung von m_2^2G bei dieser Spezies schließen.

Eine annähernd quantitative Ausscheidung von m_2^2G konnte bei Tupaias durch i.p. Injektion dieses modifizierten Nucleosids bestätigt werden.

Es ist daher möglich, aus den ausgeschiedenen Mengen der bei Säugern für tRNA spezifischen Nucleoside t^4A und m_2^2G (bei Ratten nur t^4A) auf die Ganzkörperumsätze von tRNA rückzuschließen.

Im Gegensatz dazu machen es die im Urin gefundenen Mengenverhältnisse von $m^1G + m^1Gua$ zu t^4A sowie von $m^2G + m^2Gua$ zu t^4A wahrscheinlich, daß m^1G bzw. m^2G bei einigen der untersuchten Säuger über die zugehörigen modifizierten Nucleobasen hinaus verstoffwechselt werden.

Die bei der Inkubation von m^1G , m^2G , m^1Gua und m^2Gua mit zellfreiem Überstand aus Rattenleberhomogenat gemessene Abnahme dieser RNA-Kataboliten bestätigt diese Annahme.

Das im Urin von Ratte, Tupaia, Saguinus und Pavian gefundene Mengenverhältnis des für cytoplasmatische Säuger-rRNA spezifischen Nucleosids m^3U zu dem berechenbaren Ψ -Anteil aus dem rRNA-Abbau im Urin entspricht weitgehend dem durchschnittlichen Verhältnis von m^3U zu Ψ in cytoplasmatischer rRNA von Säugern. Da quantitative Ausscheidung von Ψ bereits bei Mensch und Ratte nachgewiesen wurde, ist somit eine quantitative Ausscheidung von m^3U bei Ratte, Tupaia, Saguinus und Pavian wahrscheinlich.

Bei Tupaia wurde eine annähernd quantitative Ausscheidung von m^3U sowie von Ψ durch i.p. Injektionsversuche bestätigt.

Diese Ergebnisse legen nahe, den Ganzkörperumsatz von cytoplasmatischer rRNA in Zukunft wahlweise entweder über den berechenbaren Ψ -Anteil im Urin, der wahrscheinlich aus dem rRNA-Abbau stammt, oder direkt über die Ausscheidung des rRNA-spezifischen Nucleosids m^3U zu ermitteln.

Im Urin aller untersuchten Säuger konnte ein m^7Gua -Anteil nachgewiesen werden, der nach Abzug der berechenbaren m^7Gua -Anteile aus tRNA bzw. rRNA von der insgesamt ausgeschiedenen Menge übrigbleibt. Dieses restliche m^7Gua beläuft sich auf 45 - 75 % der jeweils insgesamt ausgeschiedenen Menge und stammt wahrscheinlich aus dem Abbau cytoplasmatischer mRNA.

Das in einem Modell (Schöch et al, 1988a) für die Verteilung einzelner RNA-Klassen in einer idealisierten Säugerzelle angenommene Mengenverhältnis von cytoplasmatischer tRNA zu cytoplasmatischer rRNA wird durch die im Urin von 6 Primaten und der Ratte ermittelte Verteilung der RNA-Kataboliten Ψ , m^2G und t⁶A im Prinzip gestützt.

Messungen der Konzentrationen der RNA-Kataboliten Ψ , m^7Gua und m^2G in Human-Serum haben ergeben, daß sich die durchschnittlichen Mengenverhältnisse von Ψ : m^7Gua : m^2G von den entsprechenden durchschnittlichen Verhältnissen in Human-Urin erheblich unterscheiden. Dieser Befund deutet auf unterschiedliche renale Ausscheidungsmechanismen für diese drei modifizierten RNA-Kataboliten. Ein Vergleich der auf Krea-

tinin bezogenen Konzentrationen von Ψ , $m^7\text{Gua}$ und $m^2_2\text{G}$ im Serum mit den entsprechenden Werten im Urin spricht für eine Nettosekretion von $m^7\text{Gua}$ und $m^2_2\text{G}$ sowie eine teilweise Rückresorption von Ψ .

Für das modifizierte Nucleosid $m^7\text{G}$ wurde eine Umwandlung im Serum in die modifizierte Nucleobase $m^7\text{Gua}$ nachgewiesen.

6. Literaturverzeichnis

Adamiak RW, Górnicki P (1985)

Hypermodified nucleosides of tRNA: synthesis, chemistry, and structural features of biological interest

Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 32: 27-74

Agarwal RP, Sagar SM, Parks RE (1975)

Adenosine deaminase from human erythrocytes: purification and effects of adenosine analogs

Biochem Pharmacol 24: 693-701

Apell G, Buschman FL, Sharma OK (1986)

Improved and rapid method for quantitation of modified nucleosides in urine and sera with radial-pak cartridge

J Chromatogr 374: 149-154

Arab L, Schellenberg B, Schlierf G (1982)

Nutrition and health: a survey of young men and women in Heidelberg

Ann Nutr Metab 26 Suppl 1: 1-244

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1983)

Molecular biology of the cell

Garland Publishing Inc, New York & London, p 412

Barankiewicz J, Gelfand EW, Issekutz A, Cohen A (1982)

Evidence for active purine nucleoside cycles in human mononuclear cells and cultured fibroblasts

J Biol Chem 257: 11597-11600

Björk GR (1984)

Modified nucleosides in RNA - their formation and function

In: Apirion D (ed) Processing of RNA, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 291-330

Bjornsson TD (1979)

Use of serum creatinine concentrations to determine renal function
Clin Pharmacokinet 4: 200-222

Borek E, Srinivasan PR (1966)

The methylation of nucleic acids
Annu Rev Biochem 35: 275-298

Borek E, Sharma OK, Waalkes TP (1983)

New applications of urinary nucleoside markers
Recent Results Cancer Res 84: 301-316

Borek E (1984)

Toward a universal tumour marker
Tumour Biol 5: 1-14

Borek E (1985)

The morass of tumor markers
Trends Biochem Sci 10: 182-184

Borek E, Sharma OK, Buschman FL, Cohn DL, Penley KA, Judson FN,
Dobozin BS, Horsburgh CR, Kirkpatrick CH (1986)

Altered excretion of modified nucleosides and β -aminoisobutyric acid
in subjects with acquired immunodeficiency syndrome or at risk for
acquired immunodeficiency syndrome
Cancer Res 46: 2557-2561

Brand RC, Klotwijk J, Sibum CP, Planta RJ (1979)

Pseudouridylation of yeast ribosomal precursor RNA
Nucleic Acids Res 7: 121-134

Buhl L, Dragsholt C, Svendsen P, Hage E, Buhl MR (1985)

Urinary hypoxanthine and pseudouridine as indicators of tumor develop-
ment in mesothelioma-transplanted nude mice
Cancer Res 45: 1159-1162

Busch H, Reddy R, Rothblum L, Choi YC (1982)

SnRNAs, SnRNPs, and RNA processing

Ann Rev Biochem 51: 617-654

Chavancy G, Chevallier A, Fournier A, Garel JP (1979)

Adaptation of iso-tRNA concentration to mRNA codon frequency in the eukaryote cell

Biochimie 61: 71-78

Chevallier A, Garel J-P (1979)

Studies on tRNA adaptation, tRNA turnover, precursor tRNA and tRNA gene distribution in *Bombyx mori* by using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

Biochimie 61: 245-262

Chevallier A, Garel J-P (1982)

Differential synthesis rates of tRNA species in the silk gland of *Bombyx mori* are required to promote tRNA adaptation to silk messages

Eur J Biochem 124: 477-482

Chheda GB, Mittelman A (1972)

N⁶-(Δ^2 isopentenyl)adenosine metabolism in man

Biochem Pharmacol 21: 27-37

Cimino F, Russo T, Esposito A, Colonna A, Ammendola R, Duilio A, Salvatore F (1985)

Pseudouridine as a tumor marker: studies on its biosynthetic enzymes in experimental neoplastic systems

Bull Mol Biol Med 10: 169-185

Colonna A, Russo T, Esposito F, Salvatore F, Cimino F (1983)

Determination of pseudouridine and other nucleosides in human blood serum by high-performance liquid chromatography

Anal Biochem 130: 19-26

Craddock VM, Mattocks AR, Magee PN (1968)

The fate of 7[¹⁴C]-methylguanine after administration to the rat

Biochem J 109: 75-78

Davis GE, Suits RD, Kuo KC, Gehrke CW, Waalkes TP, Borek E (1977)
High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of
nucleosides in urine and some other biological fluids
Clin Chem 23: 1427-1435

Delk AS, Rabinowitz JC (1975)
Biosynthesis of ribosylthymine in the transfer RNA of *Streptococcus*
faecalis: a folate-dependent methylation not involving 5-adenosyl-
methionine
Proc Natl Acad Sci 72: 528-530

Dirheimer G (1983)
Chemical nature, properties, location, and physiological and patholo-
gical variations of modified nucleosides in tRNAs
Recent Results Cancer Res 84: 15-46

Dubin DT, Taylor RH (1978)
Modification of mitochondrial ribosomal RNA from hamster cells: the
presence of GmG and late-methylated UmGmU in the large subunit
(17S) RNA
J Mol Biol 121: 523-540

Dubin DT, Taylor RH, Davenport LW (1978)
Methylation status of 13S ribosomal RNA from hamster mitochondria: the
presence of a novel riboside, N⁶-methylcytidine
Nucleic Acids Res 5: 4385-4397

Dugaiczky A, Eiler JJ (1966)
Lack of catabolism of 5-ribosyluracil in man
Nature 212: 611-612

Dutta SP, Chheda GB (1987)
Metabolism of 1-methyladenosine
Biochem Med Metab Biol 38: 69-73

Elkins BN, Keller EB (1974)

The enzymatic synthesis of N-(purin-6-ylcarbamoyl)threonine, an anti-codon-adjacent base in transfer ribonucleic acid

Biochemistry 13: 4623-4628

Fleissner E, Borek E (1962)

A new enzyme of RNA synthesis: RNA methylase

Proc Natl Acad Sci 48: 1199-1203

Flint SJ (1984)

Processing of mRNA precursors in eukaryotic cells

In: Apirion D (ed) Processing of RNA, CRC Press, Boca Raton, Florida,

pp 151-179

Fox IH (1981)

Metabolic basis for disorders of purine nucleotide degradation

Metabolism 30: 616-634

Fuchs E, Kleinknecht S (1986)

The influence of chronic social confrontation on oxygen consumption of *Tupaia belangeri* under resting conditions

Z Säugetierkunde 51: 55-57

Garel J-P (1976)

Quantitative adaptation of isoacceptor tRNAs to mRNA codons of alanine, glycine and serine

Nature 260: 805-806

Garel J-P (1982)

The silkworm, a model for molecular and cellular biologists

Trends Biochem Sci 7: 105-108

Gassen HG, Leifer W (1970)

Über einen Analysator in der Nucleinsäurechemie

Z Anal Chem 252: 337-343

Gehrke CW, Kuo KC, Davis GE, Suits RD, Waalkes TP, Borek E (1978)
Quantitative high-performance liquid chromatography of nucleosides in
biological materials

J Chromatogr 150: 455-476

Gehrke CW, Zumwalt RW, McCune RA, Kuo KC (1983)
Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of
modified nucleosides in physiological fluids, tRNA, and DNA
Recent Results Cancer Res 84: 344-359

Gehrke CW, Kuo KC (1985)
High resolution quantitative high-performance liquid chromatography -
uv-spectrometry analysis of nucleosides in tRNA, mRNA, DNA and physi-
ological fluids
Bull Mol Biol Med 10: 119-142

Gündüz U, Katze JR (1984)
Queuine salvage in mammalian cells
Evidence that queuine is generated from queuosine 5'-phosphate
J Biol Chem 259: 1110-1113

Gunning PW, Shooter EM, Austin L, Jeffrey PL (1981)
Differential and coordinate regulation of the eukaryotic small
molecular weight RNAs
J Biol Chem 256: 6663-6669

Hanoune J, Agarwal MK (1970)
Studies on the half life time of rat liver transfer RNA species
FEBS Lett 11: 78-80

Heldman DA, Grever MR, Miser JS, Trewyn RW (1983)
Relationship of urinary excretion of modified nucleosides to disease
status in childhood acute lymphoblastic leukemia
J Natl Cancer Inst 71: 269-273

Hentzen D, Chevallier A, Garel J-P (1981)

Differential usage of iso-accepting tRNA^{ser} species in silk glands
of *Bombyx mori*

Nature 290: 267-269

Hitchings GH, Falco EA (1944)

The identification of guanine in extracts of *Girella nigricans*. The
specificity of guanase

Proc Natl Acad Sci 30: 294-297

Hong CI, Chheda GB, Murphy GP, Mittelman A (1973)

Metabolism of N-(purin-6-ylcarbamoyl)-L-threonine riboside in rat and
man

Biochem Pharmacol 22: 1927-1936

Hopper AK (1984)

Genetic and biochemical studies of RNA processing in yeast

In: Apirion D (ed) Processing of RNA, CRC Press, Boca Raton, Florida,
pp 91-117

Hughes DG, Maden BEH (1978)

The pseudouridine contents of the ribosomal ribonucleic acids of three
vertebrate species

Biochem J 171: 781-786

Ikemura T (1982)

Correlation between the abundance of yeast transfer RNAs and the
occurrence of the respective codons in its protein genes

J Mol Biol 158: 573-597

Ikemura T (1985)

Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular
organisms

Mol Biol Evol 2: 13-34

Jeanteur P, Amaldi F, Attardi G (1968)

Partial sequence analysis of ribosomal RNA from HeLa cells

II. Evidence of sequences of non-ribosomal type in 45 and 32S
ribosomal RNA precursors

J Mol Biol 33: 757-775

Johnson PF, Abelson J (1983)

The yeast tRNA^{Tyr} gene intron is essential for correct modification of
its tRNA product

Nature 302: 681-687

Katze JR, Gündüz U, Smith DL, Cheng CS, McCloskey JA (1984)

Evidence that the nucleic acid base queuine is incorporated intact
into tRNA by animal cells

Biochemistry 23: 1171-1176

Kerr SJ (1985a)

Induction of adipocyte formation in 3T3L1 cells by 1-methylguanine
and 7-methylguanine

Tumour Biol 6: 115-121

Kerr SJ (1985b)

Alterations in cell surface properties induced by modified purines

Tumour Biol 6: 123-131

Kersten H, Sandig L, Arnold HH (1975)

Tetrahydrofolate-dependent 5-methyluracil-tRNA transferase activity in
B. subtilis

FEBS Lett 55: 57-60

Kersten H (1984)

On the biological significance of modified nucleosides in tRNA

Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 31: 59-114

Khan MSN, Salim M, Maden BEH (1978)

Extensive homologies between the methylated nucleotide sequences in
several vertebrate ribosomal ribonucleic acids

Biochem J 169: 531-542

Kline LK, Söll D (1982)

Nucleotide modification in RNA

The Enzymes 15: 567-582

Knapp G, Beckmann JS, Johnson PF, Fuhrman SA, Abelson J (1978)

Transcription and processing of intervening sequences in yeast tRNA genes

Cell 14: 221-236

Kulikowska E, Bzowska A, Wierzychowski J, Shugar D (1986)

Properties of two unusual, and fluorescent, substrates of purine-nucleoside phosphorylase: 7-methylguanosine and 7-methylinosine

Biochim Biophys Acta 874: 355-363

Levine L, Waalkes P, Stolbach L (1975)

Brief communication: serum levels of N^2,N^2 -dimethylguanosine and pseudouridine as determined by radioimmunoassay for patients with malignancy

J Natl Cancer Inst 54: 341-343

Litwack MD, Weissmann B (1966)

Source of urinary 8-hydroxy-7-methylguanine in man

Biochemistry 5: 3007-3012

Lothrop CD, Uziel M (1982)

Salvage of the modified nucleoside ribothymidine in cultured hamster embryo cells

Biochim Biophys Acta 698: 134-139

Lothrop CD, Uziel M (1983)

RNA turnover in cultured hamster embryo cells: identification of modified nucleoside end products

J Cell Physiol 114: 111-116

Maden BEH, Salim M (1974)

The methylated nucleotide sequences in HeLa cell ribosomal RNA and its precursors

J Mol Biol 88: 133-164

Maden (1986)

Identification of the locations of the methyl groups in 18S ribosomal RNA from *Xenopus laevis* and man

J Mol Biol 189: 681-699

Mandel LR, Borek E (1963)

The nature of the RNA synthesized during conditions of unbalanced growth in *E. coli* K₁₂W-6

Biochemistry 2: 560-566

Mandel LR, Srinivasan PR, Borek E (1966)

Origin of urinary methylated purines

Nature 209: 586-588

Maruyama T, Gojobori T, Aota S, Ikemura T (1986)

Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data

Nucleic Acids Res 14 Suppl: r151-r197

Mays LL (1983)

Posttranscriptional modification of RNA in aging organisms

In: Florini JR (ed) CRC Handbook of Biochemistry in Aging, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 65-76

Moss B (1984)

5'Terminal cap structures of eukaryotic and viral mRNAs

In: Apirion D (ed) Processing of RNA, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 119-132

Moyer JD, Malinowski N, Ayers O (1985)

Salvage of circulating pyrimidine nucleosides by tissues of the mouse

J Biol Chem 260: 2812-2818

Mrochek JE, Dinsmore SR, Waalkes TP (1974)

Analytic techniques in the separation and identification of specific purine and pyrimidine degradation products of tRNA: application to urine samples from cancer patients

J Natl Cancer Inst 53: 1553-1563

Müller J, Erb N, Heller-Schöch G, Lorenz H, Winkler K, Schöch G (1983)

Multivariate analysis of urinary RNA catabolites in malignancies:
cross-sectional and longitudinal studies

Recent Results Cancer Res 84: 317-330

Nass G, Thomale J, Luz A, Friedrich U (1985)

Excretion of modified nucleosides by malignant cells in vivo and in
vitro and its clinical relevance

Bull Mol Biol Med 10: 155-168

Nishikura K, De Robertis EM (1981)

RNA processing in microinjected *Xenopus* oocytes - sequential addition
of base modifications in a spliced transfer RNA

J Mol Biol 145: 405-420

Okada N, Noguchi S, Kasai H, Shindo-Okada N, Ohgi T, Goto T, Nishimura
S (1979)

Novel mechanism of post-transcriptional modification of tRNA

J Biol Chem 254: 3067-3073

Penzlin H (1977)

Lehrbuch der Tierphysiologie

2.Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart New York, S 47

Peters GJ, Veerkamp JH (1983)

Purine and pyrimidine metabolism in peripheral blood lymphocytes

Int J Biochem 15: 115-123

Reddy R, Henning D, Busch H (1985)

Primary and secondary structure of U8 small nuclear RNA

J Biol Chem 260: 10930-10935

Reddy R (1986)

Compilation of small RNA sequences

Nucleic Acids Res 14 Suppl: r61-r72

Remy CN (1961)

Metabolism of 6-methylaminopurine: synthesis and demethylation by
Escherichia coli

J Biol Chem 236: 2999-3005

Russo T, Colonna A, Salvatore F, Cimino F, Bridges S, Gurgo C (1984)

Serum pseudouridine as a biochemical marker in the development of AKR
mouse lymphoma

Cancer Res 44: 2567-2570

Rustum YM, Schwartz HS (1974)

Metabolism of N⁶-(Δ^2 isopentenyl)adenosine in rat liver

Biochem Pharmacol 23: 2463-2472

Salvatore F, Colonna A, Costanzo F, Russo T, Esposito F, Cimino F
(1983)

Modified nucleosides in body fluids of tumor-bearing patients

Recent Results Cancer Res 84: 360-377

Sander G, Heller-Schöch G, Wieland J, Topp H, Schöch G (1984)

RNA catabolites in urine as measure for turnover of tRNA, mRNA and
rRNA

In: Zelinka J, Balan J (eds) Metabolism and enzymology of nucleic
acids including gene manipulations, Vol 5

Symp 1984 Slovak Academy of Sciences, Bratislava, pp 365-375

Sander G, Wieland J, Topp H, Heller-Schöch G, Erb N, Schöch G (1985)

An improved method for the simultaneous analysis of normal and mod-
ified urinary nucleosides and nucleobases by high performance liquid
chromatography

Clin Chim Acta 152: 355-361

Sander G, Topp H, Wieland J, Heller-Schöch G, Schöch G (1986a)

Possible use of urinary modified RNA metabolites in the measurement of
RNA turnover in the human body

Hum Nutr Clin Nutr 40C: 103-118

Sander G, Topp H, Heller-Schöch G, Wieland J, Schöch G (1986b)
Ribonucleic acid turnover in man: RNA catabolites in urine as measure
for the metabolism of each of the three major species of RNA
Clin Sci 71: 367-374

Sander G, Hülsemann J, Topp H, Heller-Schöch G, Schöch G (1986c)
Protein and RNA turnover in preterm infants and adults: a comparison
based on urinary excretion of 3-methylhistidine and of modified one-
way RNA catabolites
Ann Nutr Metab 30: 137-142

Schöch G, Heller-Schöch G (1977)
Molekularbiologie und klinische Bedeutung des Stoffwechsels normaler
und modifizierter Nucleobasen
Helv Paediatr Acta Suppl 38: 7-171

Schöch G, Garbrecht M, Heller-Schöch G, Baisch H, Leifer W (1979)
Die Ausscheidung von normalen und modifizierten Nucleobasen im Urin
bei chronischen myeloproliferativen Syndromen
Blut 38: 391-396

Schöch G, Thomale J, Lorenz H, Suberg H, Karsten U (1980)
A new method for the simultaneous analysis of unmodified and modified
urinary nucleosides and nucleobases by high performance liquid chroma-
tography
Clin Chim Acta 108: 247-257

Schöch G, Lorenz H, Heller-Schöch G, Baisch H, Clemens P (1981)
Die Altersabhängigkeit der normalen und modifizierten Nucleobasen im
Urin als Ausdruck der Wachstumsgeschwindigkeit
Monatsschr Kinderheilkd 129: 29-33

Schöch G, Heller-Schöch G, Müller J, Clemens P, Holtgrewe A, Heddrich
M (1983)
Die Ausscheidung normaler und modifizierter RNA-Kataboliten sowie von
Kreatinin im Urin in Abhängigkeit von der Ernährung bei Kindern
Monatsschr Kinderheilkd 131: 259-263

- Schöch G, Sander G, Topp H, Heller-Schöch G (1988a, in press)
Modified nucleosides and nucleobases in urine and serum as selective markers for the whole-body turnover of tRNA, rRNA and mRNA-cap - future prospects and impact
In: Gehrke CW, Kuo KC (eds) Chromatographic and Other Analytical Methods in Nucleic Acids Modification Research, Vol II Modified Nucleosides in Cancer and Normal Metabolism, Elsevier, Amsterdam
- Schöch G, Sander G, Heller-Schöch G, Topp H, Telaar B (1988b)
Protein- und RNA-Umsatz bei Frühgeborenen
In: Haschke F (Hrsg) Protein in der Säuglingsernährung. Bücherei des Pädiaters, Bd. 92, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S. 26-39
- Shamma'a MH, Nasrallah S, Chaglassian T, Kachadurian AK, al-Khalidi UAS (1965)
Serum xanthine oxidase: a sensitive test of acute liver injury
Gastroenterology 48: 226-230
- Sharma OK, Waalkes TP, Gehrke CW, Borek E (1983)
Applications of urinary nucleosides in cancer diagnosis and cancer management
Cancer Detect Prev 6: 77-85
- Shindo-Okada N, Okada N, Ohgi T, Goto T, Nishimura S (1980)
Transfer ribonucleic acid guanine transglycosylase isolated from rat liver
Biochemistry 19: 395-400
- Singhal RP (1974)
Separation and analysis of nucleic acids and their constituents by ion-exclusion and ion-exchange column chromatography
Separ Purif Methods 3: 339-398
- Skupp S, Ayvazian JH (1969)
Oxidation of 7-methylguanine by human xanthine oxidase
J Lab Clin Med 73: 909-916

Söll D, Kline LK (1982)

RNA methylation

The Enzymes 15: 557-566

Speer J, Gehrke CW, Kuo KC, Waalkes TP, Borek E (1979)

tRNA breakdown products as markers for cancer

Cancer 44: 2120-2123

Sprinzi M, Moll J, Meissner F, Hartmann T (1985)

Compilation of tRNA sequences

Nucleic Acids Res 13 Suppl: r1-r49

Sprinzi M, Hartmann T, Meissner F, Moll J, Vorderwülbecke T (1987)

Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes

Nucleic Acids Res 15 Suppl: r53-r188

Thomale J, Nass G (1982)

Elevated urinary excretion of RNA catabolites as an early signal of tumor development in mice

Cancer Lett 15: 149-159

Thomale J, Luz A, Nass G (1983)

Increased urinary levels of RNA catabolites in mice as early indicators for malignant growth

Cancer Detect Prev 6: 73-76

Thomas G, Gordon J, Rogg H (1978)

N⁶-acetylcytidine. A previously unidentified labile component of the small subunit of eukaryotic ribosomes

J Biol Chem 253: 1101-1105

Topp H, Sander G, Heller-Schöch G, Schöch G (1985)

A high-performance liquid chromatographic method for the determination of pseudouridine and uric acid in native human urine and ultrafiltrated serum

Anal Biochem 150: 353-358

Topp H, Sander G, Heller-Schöch G, Gülzow J, Schöch G (1986)

Die Abhängigkeit der Pseudouridinausscheidung im Urin vom Lebensalter
Ernähr-Umschau 33: 92

Topp H, Sander G, Heller-Schöch G, Schöch G (1987)

Determination of 7-methylguanine, N²,N²-dimethylguanosine, and pseudo-
uridine in ultrafiltrated serum of healthy adults by high-performance
liquid chromatography
Anal Biochem 161: 49-56

Trewyn RW, Kerr SJ (1978)

Altered growth properties of chinese hamster cells exposed to
1-methylguanine and 7-methylguanine
Cancer Res 38: 2285-2289

Trewyn RW, Glaser R, Kelly DR, Jackson DG, Graham WP, Speicher CE
(1982)

Elevated nucleoside excretion by patients with nasopharyngeal
carcinoma
Cancer 49: 2513-2517

Uziel M, Koh CK, Cohn WE (1968)

Rapid ion-exchange chromatographic microanalysis of ultraviolet-ab-
sorbing materials and its application to nucleosides
Anal Biochem 25: 77-98

Uziel M, Smith LH, Taylor SA (1976)

Modified nucleosides in urine: selective removal and analysis
Clin Chem 22: 1451-1455

Vold BS, Keith DE, Slavik M (1982)

Urine levels of N-[9-(β -D-ribofuranosyl)purin-6-ylcarbamoyl]-L-threo-
nine, N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenosine, and 2'-O-methylguanosine as de-
termined by radioimmunoassay for normal subjects and cancer patients
Cancer Res 42: 5265-5269

Vold BS, Kraus LE, Rimer VG, Coombes RC (1986)

Use of a monoclonal antibody to detect elevated levels of a modified nucleoside, N-[9-(β -D-ribofuranosyl)purin-6-ylcarbamoyl]-L-threonine, in the urine of breast cancer patients

Cancer Res 46: 3164-3167

Waalkes TP, Borek E (1976)

The biochemical assessment of the malignant status in man: aspects related to tRNA modification

In: Davis W, Maltoni C (eds) Biological Characterization of Human Tumours, Internat Congress Series, No 375, Exc Medica, Amsterdam, pp 15-31

Warner JR (1974)

The assembly of ribosomes in eukaryotes

In: Nomura M, Tissieres A, Lengyel P (eds) Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, pp 461-488

Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM (1987)

Molecular Biology of the Gene, 4th ed

Vol I. General Principles, Benjamin/Cummings, Menlo Park, California, pp 441-443

Wei CM (1975)

N⁶,O^{2'}-dimethyladenosine a novel methylated ribonucleoside next to the 5'terminal of animal cell and virus mRNAs

Nature 257: 251-252

Weissman S, Eisen AZ, Lewis M, Karon M, Clark P (1962)

Pseudouridine metabolism

III. Studies with isotopically labeled pseudouridine

J Lab Clin Med 60: 40-47

Weissmann B, Gutman AB (1957a)

The identification of 6-succinoaminopurine and of 8-hydroxy-7-methyl-guanine as normal human urinary constituents

J Biol Chem 229: 239-250

Weissmann B, Bromberg PA, Gutman AB (1957b)

The purine bases of human urine

II. Semiquantitative estimation and isotope incorporation

J Biol Chem 224: 423-434

Zöttlner N (1982)

Purine and pyrimidine metabolism

Proc Nutr Soc 41: 329-342

Diese Arbeit wäre ohne die großzügige Unterstützung von vielen Seiten nicht zustande gekommen. Mein besonders herzlicher Dank gilt

Herrn Prof. Dr. O. Pongs (Lehrstuhl Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum) für die bereitwillig übernommene Betreuung der vorliegenden Arbeit;

Herrn Prof. Dr. W. Rüger (Arbeitsgruppe Molekulare Genetik am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen) für die Befürwortung der Arbeit bei der Abteilung für Biologie an der Ruhr-Universität Bochum, sowie für die Übernahme des Korreferats;

Herrn Prof. Dr. G. Schöich (Forschungsinstitut für Kinderernährung Dortmund) für die Stellung des Themas und die stete kritische und anregende Förderung der Arbeit;

Herrn Dr. G. Sander, Leiter der Arbeitsgruppe Klinische Molekularbiologie am Forschungsinstitut für Kinderernährung Dortmund, für jederzeit gewährte hervorragende Beratung;

Herrn Dr. E. Fuchs am Deutschen Primatenzentrum (DPZ) in Göttingen für die Durchführung der aufwendigen Injektionsversuche bei Tupaias, für die Gewinnung von Urinproben verschiedener Primaten sowie von Gewebsproben;

Herrn Prof. Dr. H.-J. Kuhn, Direktor des Deutschen Primatenzentrums, für die Erlaubnis zur Zusammenarbeit mit dem DPZ;

Herrn Prof. Dr. H. M. Bolt, Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, für die Unterstützung bei den Untersuchungen an Ratten;

Herrn Prof. Dr. E. Schmidt, Universitäts-Kinderklinik B in Düsseldorf, für die Hilfe bei der Gewinnung von Urinproben frühgeborener Kinder;

Frau Dr. B. S. Vold, Biomedical Research Laboratory, SRI International, Menlo Park California, für die Bereitstellung des Ribonucleosid-Standards t⁶A sowie

den Mitarbeitern des Forschungsinstitutes für Kinderernährung Dortmund für die Bereitstellung von Blut und Urin sowie für eine jahrelange ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Lebenslauf

1. Angaben zur Person

Name	Heinrich Topp
Geburtstag und -ort	08.06.1957 in Hagen
Familienstand	verheiratet, ein Kind
Staatsangehörigkeit	deutsch

2. Ausbildungsdaten

1964 - 1969	Besuch der Gemeinschafts-Hauptschule in Herdecke
1969 - 1976	Besuch des Friedrich-Harkort-Gymnasiums in Herdecke
02.06.1976	Reifeprüfung
10.1976 - 09.1982	Biologiestudium an der Ruhr-Universität Bochum
10.09.1982	Diplomprüfung im Fach Biologie
03.1983	Beginn der Dissertation am Forschungs- institut für Kinderernährung in Dortmund. Betreuung durch Herrn Prof. Dr. O. Pongs, Lehrstuhl Biochemie, Ruhr-Universität Bochum, und Herrn Prof. Dr. W. Rüger, Arbeitsgruppe Molekulare Genetik am Lehr- stuhl für Biologie der Mikroorganismen, Ruhr-Universität Bochum. Anleitung durch Herrn Prof. Dr. G. Schöch, Forschungs- institut für Kinderernährung Dortmund.

